

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
PROGRAMA DE DOCTORADO EN BIOCIENCIAS MOLECULARES



**CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DE LOS
SÍNDROMES MIELODISPLÁSICOS**
**Biomarcadores pronósticos y
evolución clonal a
leucemia mieloide aguda**

TESIS DOCTORAL

MIREIA ATANCE PASARISAS

2020

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA
FACULTAD DE MEDICINA
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DE LOS SÍNDROMES MIELODISPLÁSICOS

Biomarcadores pronósticos y evolución clonal a leucemia mieloide aguda

Memoria presentada por

MIREIA ATANCE PASARISAS

Licenciada en Bioquímica,
para optar al grado de Doctor por la Universidad Autónoma de Madrid

Directores de Tesis:

DRA. PILAR LLAMAS SILLERO
DRA. ROCÍO NIEVES SALGADO SÁNCHEZ

Instituto de Investigación Sanitaria- Fundación Jiménez Díaz

Servicio de Hematología y Hemoterapia del Hospital Universitario
Fundación Jiménez Díaz



PILAR LLAMAS SILLERO, Doctora en Medicina y Cirugía, profesora asociada del Departamento de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid, Jefe del Servicio de Hematología y Hemoterapia del Hospital Universitario Fundación Jiménez Díaz y Jefe del grupo de Hematología Experimental del Instituto de Investigación Sanitaria Fundación Jiménez Díaz (IIS-FJD)

y

ROCÍO NIEVES SALGADO SÁNCHEZ, Doctora en Ciencias (Biología) y responsable del Laboratorio de Citogenética del Hospital Universitario Fundación Jiménez Díaz, investigadora del grupo de Hematología Experimental del Instituto de Investigación Sanitaria Fundación Jiménez Díaz (IIS-FJD).

CERTIFICAN que la Tesis Doctoral titulada “**CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DE LOS SÍNDROMES MIELODISPLÁSICOS Biomarcadores pronósticos y evolución clonal a leucemia mieloide aguda**” ha sido realizada bajo nuestra dirección por **Mireia Atance Pasarisas**, licenciada en Bioquímica, y reúne, a nuestro juicio, las condiciones de originalidad, metodología y desarrollo científicos suficientes para su presentación y defensa en el Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid, para optar al grado de Doctor.

Fdo.
Dra. Pilar Llamas Sillero

Fdo.
Dra. Rocío Nieves Salgado Sánchez

Madrid, 24 de Febrero de 2020

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar me gustaría dar las gracias a mis directoras de tesis, Pilar y Rocío. Pilar, mil gracias por dejarme formar parte de este equipo, nunca podré agradecerte suficiente tu estímulo, entusiasmo y dedicación. Es una gran suerte poder contar con un jefe de tanto nivel profesional y humano. Y Rocío.... que decir... nunca podré agradecerte suficiente todo lo que haces por mí. Ya sabes que eres mi referente y mi ejemplo a seguir, no tan solo a nivel profesional sino como persona. Os debemos una super comida a toda la familia!!!

Agradecer también a todos los que he tenido el placer de compartir el día a día desde que llegué al laboratorio, en especial a Carlos por enseñarme TODO lo que se de biología molecular sin perder nunca la paciencia, es un placer aprender de ti; a Loli y a Mari Luz, fuisteis mis mamis de Madrid cuando llegué, nunca olvidaré vuestros consejos; a Javi, ahora lo pienso y debías reírte mucho cuando me emocionaba por hacer un ficoll..., a todos los que habéis y formáis parte de este pequeño gran laboratorio, Carmen, Mila, Amanda, y en especial a Juanma, por siempre estar dispuesto a echar una mano en el maravilloso mundo de la estadística y en todo lo demás. A todo el equipo que forma la gran familia de Hematología de la FJD, en especial al laboratorio de Citometría: Cris, Raquel M., María, Raquel G., y Tamarita, nunca olvidaré nuestra gran noche ni tu sofá; por vuestra sonrisa y apoyo siempre.

Dar las gracias también a todo el equipo de Hematología de la FJD y los demás centros de la Comunidad de Madrid, en especial a Carlos S. y M^a José por hacer fácil la citología con siempre tan buena disposición, a Teresa A. por sus ánimos y entusiasmo en la patología mieloide, a todos los clínicos Marian, Elham, Elena, José Luis, Javi ... no os puedo nombrar a todos que somos ya más de 40! No quiero olvidarme del laboratorio de Hematología Experimental, a Juana que me ha iniciado en el mundo de la Citometría y por sus inagotables ideas y proyectos. Ni a Arancha, gracias siempre por estar tan dispuesta a ayudar y a animarme! Y a las croquetas de tu madre, claro!

Mis agradecimientos también a Juan C. Cigudosa y a Sara Álvarez por poder participar en este proyecto de secuenciación masiva con el panel de ThermoFisher y a todo el equipo de NIMGenetics, por su trabajo en la preparación de librerías y secuenciación, en especial a Paolo y a Javier. También agradecer a Diego de SOPHIA GENETICS por su

gran disposición y ayuda en la implementación del panel mieloide y otra vez, mil gracias a Javier por sus indicaciones y explicaciones técnicas. Quiero también agradecer al servicio de Anatomía Patológica, en especial a Jeni, Rebeca e Iván por su predisposición y ayuda en el uso del Miseq, así como al departamento de Genética, en especial a Camilo, Jesús y Migue Ángel por su ayuda y colaboración con el Nextseq. Dar las gracias también a Júlia, que me clarificó el mundo de los Fishplot!!

També donar les gràcies a les meves nines: Judit, Ari, Esther, sense el vostre suport y ànims això hagués estat misión imposible!!!En breus fem un reencuentro on poguem dirnos un Us ESTIMO MOLT!!!També a les meves amigues químiques... que ha plogut molt pero per molts anys més de riures, vermutos, canyes, BODAS... i el que faci falta!! També una menció especial a la Laura, sense tu la Hemato no sería el mateix! M'encanten aquests reencuentros!!!

Pero sin duda quiero agradecer a toda mi familia, también a mi nueva familia de Madrid, todo el cariño, apoyo e ilusión que me habéis dado siempre. Estamos pasando por unos años complicados, pero si continuamos juntos podremos superarlo! Os quiero Mucho!!!

Agradecer también especialmente a mis padres, siempre habéis estado conmigo, apoyándome y motivándome cuando ya no me quedaban fuerzas. Os lo agradezco tanto... no sólo ahora sino en todo, que quizás no os lo digo suficiente. Mama, sense tu hagués estat imposible, mil gràcies!!

Finalmente, agradecerte a ti, Pablo, la infinita paciencia que has tenido con este proyecto personal que para mí ha significado tanto. Por fin vemos la luz!!! Gracias por estar aquí, gracias por cuidarme, gracias por quererme y gracias por toda esta locura de edición de la tesis!!

Y a ti Laia, has iluminado nuestras vidas y solo espero que seas tan feliz y cumplas todos tus sueños como nosotros.

RESUMEN

La citogenética convencional y los hallazgos analíticos y citomofológicos son los parámetros incluidos en el *score* IPSS-R (*Revised-International Prognostic Scoring System*) para la estratificación y pronóstico de los síndromes mielodisplásicos (SMD). Recientemente, se ha estudiado su perfil mutacional y se han establecido algunas asociaciones con el pronóstico y el riesgo de progresión a leucemia mieloide aguda (LMA). El objetivo de este trabajo fue analizar la asociación entre el perfil mutacional y las características clínicas, así como, evaluar el impacto pronóstico de estas variantes en la supervivencia global (SG) y libre de transformación a LMA (SLT). Además, se analizaron los diferentes patrones de evolución clonal y los parámetros pronósticos genéticos y fenotípicos relacionados.

Se estudiaron 106 muestras de pacientes con SMD mediante técnicas de secuenciación masiva y se analizaron las posibles asociaciones entre las características clínicas, genéticas y fenotípicas. Además, se establecieron los patrones de evolución clonal de 23 pacientes en 51 muestras durante la enfermedad.

Se detectó al menos una variante en 92 pacientes, con una mediana de 2 por muestra analizada. Los genes *SF3B1*, *TET2*, *ASXL1*, *DNMT3A*, *SRSF2*, *RUNX1*, *TP53* y *U2AF1* fueron los más frecuentemente alterados. Los genes relacionados con el *splicing* del ARN fueron los más afectados, seguidos de los relacionados con la metilación del ADN. Los subtipos con displasia multilínea y exceso de blastos presentaron un perfil molecular heterogéneo y con un mayor número de variantes. El IPSS-R, el número de mutaciones (≥ 4), el estatus mutacional de *U2AF1* y *TP53* fueron factores pronósticos independientes en los análisis de supervivencia. Se establecieron los patrones de evolución clonal y se observó como la adquisición de nuevas variantes (la mayoría de Tipo I) se asoció con una menor SLT. Finalmente, en un subgrupo de pacientes que evolucionaron a LMA, se detectó un aumento de las células mesenquimales-like (MSC-like) tras el tratamiento con azacitidina y tras adquirir variantes.

El estudio del perfil mutacional es esencial para la correcta estratificación y pronóstico. El aumento de las MSC-like junto con la adquisición de variantes de Tipo I selecciona un subgrupo de pacientes tratados con azacitidina que podrían beneficiarse de terapias específicas para evitar la progresión a LMA.

SUMMARY

Conventional cytogenetics, cytomorphology and peripheral blood are the prognostic parameters included in the Revised International Prognostic Scoring System (IPSS-R) for stratification and prognostication of Myelodysplastic Syndromes (MDS). Recently, the mutational profile of this group of hematological malignancies was widely studied and some associations with prognostic and risk of progression to acute myeloid leukemia (AML) have been established. The aim of our study was to analyze the association between the mutational profile and the clinical characteristics, as well as, to evaluate the prognostic impact of these mutations in the overall and leukemia free survival. Moreover, we analyzed the different patterns of clonal evolution and the prognostic genetic and phenotypic parameters related.

106 bone marrow samples from MDS patients have been analyzed using next generation sequencing (NGS) approaches. In addition, clonal evolution has been studied in 51 samples from 23 patients during the disease. Associations between the genetic and clinical characteristics have been analyzed.

At least, one mutation was described in 92 patients with a median of 2 mutations per sample. Mutation in *SF3B1*, *TET2*, *ASXL1*, *DNMT3A*, *SRSF2*, *RUNX1*, *TP53* and *U2AF1* were observed in more than 10% of patients. Splicing related genes were the most affected followed by DNA methylation. MDS with multilineage dysplasia and MDS with excess blasts had a heterogeneous molecular profile and presented more mutations. The IPSS-R, the number of mutations (≥ 4) and the mutational status of *TP53* and *U2AF1* were detected as independent prognostic factors in the survival analyses. Moreover, lineal and branched clonal evolution has been analyzed. The acquisition of new mutations (most of them Type I mutations) was associated to a short leukemia-free survival. Finally, an increase of CD13 antigen in mesenchymal stromal cells-like (MSC-like) have been detected, in a subset of high risk MDS that evolves to AML previously treated with azacitidine and acquired mutations.

The study of the mutational profile is becoming essential for the correct stratification and the prognostic establishment of the MDS. CD13 expression together the acquisition of Type I mutations select a subset of azacitidine MDS-treated patients that could benefit of targeted therapies to avoid the AML progression.

ÍNDICE

ABREVIATURAS.....	1
INTRODUCCIÓN	5
1. SÍNDROMES MIELODISPLÁSICOS.....	7
1.1 ETIOLOGÍA	7
1.2 CLASIFICACIÓN	10
1.3 PRONÓSTICO Y EVOLUCIÓN	10
1.4 TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO	12
1.4.1 ESTUDIO MORFOLÓGICO	12
1.4.2 CITOMETRÍA DE FLUJO	12
1.4.3 CITOGENÉTICA.....	13
1.4.3.1 Cariotipo	13
1.4.3.2 Hibridación <i>in situ</i> fluorescente (FISH)	16
1.4.4 SECUENCIACIÓN	16
1.4.4.1 Secuenciación de <i>Sanger</i>	16
1.4.4.2 Secuenciación masiva	17
1.4.4.3 Estudios de NGS en SMD y genes recurrentemente mutados	17
1.5 TRATAMIENTO	25
1.5.1 NUEVAS TERAPIAS	26
OBJETIVOS	27
MATERIAL Y MÉTODOS	31
1. MATERIAL	33
1.1 PACIENTES DE LA COHORTE	33
1.1.1 VARIABLES CLÍNICAS.....	33
2. MÉTODOS	33
2.1 CITOGENÉTICA CONVENCIONAL	33
2.2 HIBRIDACIÓN <i>IN SITU</i> FLUORESCENTE	34
2.3 EXTRACCIÓN DE ADN	35
2.4 SECUENCIACIÓN <i>SANGER</i>	35
2.4.1 SECUENCIACIÓN <i>SANGER</i> DE <i>TP53</i> EN PACIENTES CON del(5q)	35
2.4.2 SECUENCIACIÓN <i>SANGER</i> DE <i>ASXL1</i>	36
2.5 SECUENCIACIÓN MASIVA	36
2.5.1 TECNOLOGÍA ION TORRENT Y ANÁLISIS DE LAS VARIANTES.....	39
2.5.2 TECNOLOGÍA ILLUMINA Y ANÁLISIS DE LAS VARIANTES	41
2.5.3 ANÁLISIS DE LA EVOLUCIÓN CLONAL	42

2.6	ANÁLISIS DEL FENOTIPO	43
2.7	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	43
RESULTADOS		45
1.	RESULTADOS I - Caracterización genética de los SMD: Asociación del perfil mutacional con las características clínicas y supervivencia.	47
1.1	DESCRIPCIÓN DE PACIENTES Y MUESTRAS	49
1.2	ESTUDIOS CITOGENÉTICOS: CARIOTIPO Y FISH	51
1.3	SECUENCIACIÓN <i>SANGER</i>	53
1.4	SECUENCIACIÓN MASIVA	53
1.4.1	Comparación de las plataformas empleadas	54
1.4.2	Información genética obtenida en los 106 pacientes de SMD	54
1.4.3	Genes y vías celulares más frecuentemente alteradas	55
1.4.4	Perfil molecular según el subtipo de SMD	58
1.4.5	Genes más frecuentemente alterados: descripción de las variantes y asociación con características clínicas de los pacientes	62
1.4.6	Análisis de la supervivencia	64
1.4.6.1	Asociación entre las características clínicas y la supervivencia global y libre de transformación a LMA de los pacientes con SMD	64
1.4.6.2	Asociación entre las características genéticas y la supervivencia global y libre de transformación a LMA	67
2.	RESULTADOS II - Evolución clonal y relación fenotipo-genotipo de los SMD: Papel del perfil mutacional y del microambiente.	71
2.1	DESCRIPCIÓN DE PACIENTES Y MUESTRAS	73
2.2	ESTUDIOS CITOGENÉTICOS: CARIOTIPO Y FISH	75
2.3	SECUENCIACIÓN <i>SANGER</i> DE <i>ASXL1</i>	76
2.4	SECUENCIACIÓN MASIVA	76
2.4.1	Genes y vías más frecuentemente alteradas	76
2.4.2	Evolución clonal	78
2.4.3	Asociación entre los parámetros clínicos y genéticos y el riesgo de transformación a LMA	89
2.4.4	Análisis de la supervivencia	90
2.5	ANÁLISIS MEDIANTE CITOMETRÍA DE FLUJO	91
2.5.1	Relación fenotipo-genotipo y evolución clonal	91
2.5.2	Asociación de células mesenquimales, respuesta al tratamiento con azacitidina y adquisición de variantes patogénicas	91
DISCUSIÓN		101

1.	PERFIL GENÉTICO DE LOS SINDROMES MIELODISPLÁSICOS	103
1.1	UTILIDAD DE LA TÉCNICA DE CARIOTIPO Y FISH EN EL PRONÓSTICO DE LOS SMD	103
1.2	UTILIDAD DE LA TÉCNICA DE SECUENCIACIÓN MASIVA Y SIGNIFICADO PRONÓSTICO DEL PERFIL MOLECULAR	104
1.2.1	Comparación de plataformas	104
1.2.2	Perfil molecular de los SMD	106
1.2.3	Valor pronóstico del perfil genético: hacia un IPSS-R molecular	109
2.	MECANISMOS DE EVOLUCIÓN CLONAL DE LOS SMD	112
2.1	ADQUISICIÓN DE ALTERACIONES CITOGÉNÉTICAS	112
2.2	ADQUISICIÓN DE VARIANTES PATOGENÉTICAS	112
2.3	TIPOS DE EVOLUCIÓN CLONAL	113
2.4	RELACIÓN FENOTIPO-GENOTIPO Y PAPEL DE LAS CÉLULAS MESENQUIMALES	115
	CONCLUSIONES	119
	BIBLIOGRAFÍA	123
	ANEXO	141
	PUBLICACIONES	143
	COMUNICACIONES EN CONGRESOS	144

ABREVIATURAS

AMO	Aspirado de médula ósea
ARCH	Hematopoyesis clonal relacionada con la edad (del inglés, <i>Aging Related Clonal Hematopoiesis</i>)
AZA	5-Azacitidina
CBF	<i>Core Binding Factor</i>
CCUS	Citopenia clonal de significado incierto (del inglés, <i>Clonal Cytopenias of Uncertain Significance</i>)
CHIP	Hematopoyesis clonal de potencial indeterminado (del inglés, <i>Clonal Hematopoyesis of Indeterminate Potential</i>)
CMF	Citometría de flujo
ddNTPs	Dideoxinucleótidos trifosfato (del inglés, <i>dideoxynucleotide triphosphates</i>)
DEC	Decitabina
dNTPs	Deoxinucleótidos trifosfato (del inglés, <i>deoxynucleotide triphosphates</i>)
ELN	European Leukemia Net
EPO	Eritropoyetina
HSC	Célula madre hematopoyética (del inglés, <i>Hematopoietic stem cell</i>)
ICUS	Citopenia idiopática de significado incierto (del inglés, <i>Idiopathic Cytopenias of Uncertain Significance</i>)
IDUS	Displasia idiopática de significado desconocido (del inglés, <i>Idiopathic Dysplasia of Unknown Significance</i>)
IGV	Visualizador genómico integrativo (del inglés, <i>Integrative Genomics Viewer</i>)
IPSS	Sistema de puntuación internacional (del inglés, <i>International Scoring System</i>)
ISCN	Sistema internacional de nomenclatura de citogenómica humana (del inglés, <i>International System for Human Cytogenomic Nomenclature</i>)
ISCT	Sociedad Internacional para la Terapia Celular (del inglés, <i>International Society for Cellular Therapy</i>)
LENA	Lenalidomida
LMA	Leucemia mieloide aguda
LMMC	Leucemia mielomonocítica crónica

MO	Médula ósea
MSC	Células mesenquimales (del inglés, <i>mesenchymal cell</i>)
NGS	Secuenciación masiva (del inglés, <i>next generation sequencing</i>)
NH	Nicho hematopoyético
OMS	Organización Mundial de la Salud
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (del inglés, <i>polymerase chain reaction</i>)
Qscore	Puntuación de calidad de Phred (del inglés, <i>Phred quality score</i>)
SA	Sideroblastos en anillo
SG	Supervivencia global
SLT	Supervivencia libre de transformación a LMA
SMD/SMP	Síndromes Mielodisplásicos/Mieloproliferativos
SMD	Síndromes Mielodisplásicos
SMD-I	Síndromes Mielodisplásicos inclasificables
snRNP	Ribonucleoproteínas nucleares pequeñas snRNP (del inglés, <i>small nuclear ribonucleoprotein</i>)
SP	Sangre periférica
SSC	Dispersión lateral (del inglés, <i>Side Scatter</i>)
TPH	Trasplante de progenitores hematopoyéticos
VAF	Fracción alélica de la variante (del inglés, <i>variant allele fraction</i>)

INTRODUCCIÓN

1. SÍNDROMES MIELODISPLÁSICOS

Los síndromes mielodisplásicos (SMD) engloban un conjunto de enfermedades neoplásicas clonales que afectan a la célula madre hematopoyética. Se caracterizan por presentar una hematopoyesis ineficaz, citopenias, displasia celular y un curso clínico y supervivencia variables, con una evolución a leucemia mieloide aguda (LMA) del 35% a los 5 años¹. La incidencia es de 3-5 casos/100.000 habitantes/año² con una edad media de aparición de 75 años y con una frecuencia mayor en hombres³, aunque también puede presentarse en adultos jóvenes.

1.1 ETIOLOGÍA

Factores genéticos

Los pacientes con síndrome de *Diamond-Blackfan*, síndrome de *Scwachman-Diamond*, disqueratosis congénita, anemia de Fanconi y otras neutropenias severas congénitas presentan una mayor incidencia de neoplasias mieloides⁴. Además de estos síndromes, se ha descrito que las variantes patogénicas germinales en los genes *ANKRD26*, *CEBPA*, *DDX41*, *ELANE*, *ETV6*, *GATA2*, *HAX1*, *RUNX1*, *SAMD9*, *SAMD9L* y *SRP72* aumentan el riesgo de padecer una neoplasia hematológica⁵. Algunos de estos genes (*CEBPA*, *DDX41*, *RUNX1*, *ANKRD26*, *ETV6* y *GATA2*), ya se encuentran descritos en la Clasificación de Neoplasias Mieloides y Linfoides de la Organización Mundial de la Salud (OMS)¹ incluidas en la categoría de neoplasias mieloides con predisposición genética.

En ocasiones, no se cumplen los criterios diagnósticos de SMD, pero puede detectarse una citopenia de significado incierto (*ICUS*, del inglés *idiopathic cytopenias of uncertain significance*) o una displasia de significado desconocido (*IDUS*, del inglés *idiopathic dysplasia of unknown significance*)². Actualmente, se encuentra en discusión el significado de la hematopoyesis clonal de significado incierto (*CHIP*, del inglés *clonal hematopoyesis of indeterminate potential*), que se define como la presencia de variantes patogénicas somáticas en sangre periférica o en médula ósea (MO) en genes relacionados con patologías mieloides y en una frecuencia alélica (VAF, del inglés *variant allele fraction*) menor al 10%. La presencia de estas variantes en individuos

sanos de edad avanzada parece tener un significado benigno, denominándose *ARCH* (del inglés, *aging related clonal hematopoiesis*). Sin embargo, en individuos con variantes patogénicas en genes *drivers* (*DNMT3A*, *TET2*, *ASXL1*, *SF3B1*, *JAK2*, *SRSF2* y *TP53* mayoritariamente), con VAF superiores al 10% y con hematopoyesis anómala, se denomina citopenia clonal de significado incierto (CCUS, del inglés *clonal cytopenias of uncertain significance*). Los individuos con CCUS parecen presentar un riesgo mayor de desarrollar neoplasias mieloides^{6,7} (Tabla 1).

Tabla 1. Acrónimos usados en las etapas pre-SMD.

Acrónimo	Significado	Criterio diagnóstico
ICUS	Citopenia de significado incierto	Citopenia persistente ^a , no criterio de SMD, displasia <10%, blastos <5%, no alteración genética de SMD ^b
IDUS	Displasia de significado desconocido	No citopenia persistente ^a , no criterio de SMD, displasia >10%, blastos<5%, no alteración genética de SMD ^b
CHIP	Hematopoyesis clonal de potencial indeterminado	No citopenia persistente ^a , no criterio de SMD, displasia <10%, blastos <5%, alteración genética de SMD ^b
CCUS	Citopenia clonal de significado incierto	Citopenia persistente ^a , no criterio de SMD, displasia<10%, blastos <5%, alteración genética de SMD ^b
ARCH	Hematopoyesis clonal relacionada con la edad	No citopenia persistente ^a , no criterio de SMD, displasia <10%, blastos <5%, alteración genética de SMD ^b , edad avanzada

^a Citopenia persistente (≥4 meses). ^b Alteraciones típicas de SMD detectadas por citogenética convencional, FISH o secuenciación.

Factores adquiridos

Un 20% de los SMD se originan en respuesta a agentes externos y se definen como SMD secundarios. Este subgrupo presenta un cariotipo con pérdidas cromosómicas que involucran a los cromosomas 5 y 7, mayoritariamente en el contexto de un cariotipo complejo. Un 20-30% de estos pacientes, presentan un periodo de latencia inferior a los 5 años y se relacionan con terapias que incluyen inhibidores de la topoisomerasa II.

Papel del microambiente

El microambiente dentro de la MO está formado principalmente por células mesenquimales (MSC, del inglés *Mesenchymal Stroma Cells*)⁸. Según la *International Society for Cellular Therapy* (ISCT), las MSC deben cumplir tres requisitos mínimos: i) la capacidad de diferenciarse a otros tipos celulares tales como células formadoras de hueso (osteoblastos), cartílago (condrocitos) y adipocitos⁹; ii) deben presentar una morfología fibroblastoide en cultivo; y iii) presentar un perfil inmunofenotípico específico por citometría de flujo. Así, deben expresar los marcadores de superficie CD73, CD90 y CD105 en ausencia de CD11b, CD14, CD34, CD45, CD79α y HLA-DR¹⁰. Se han descrito también otros marcadores de superficie adicionales¹¹, como los marcadores CD13, CD15, CD140b, CD271, CD144, CD146 y CD164, detectados en las células madre mesenquimales aisladas de la MO¹². De hecho, un perfil inmunofenotípico robusto para la identificación de las MSC de MO, tanto en situaciones fisiológicas como reactivas, es el basado en CD13^{high}, CD105⁺ y CD45¹³. El marcador de superficie CD13, una peptidasa multifactorial, también puede encontrarse en la superficie de células mieloides, endoteliales y epiteliales, contribuyendo a la adhesión, migración celular, angiogénesis y respuesta inflamatoria¹⁴.

El nicho hematopoyético permite la interacción o “*crosstalking*” entre las células hematopoyéticas y las del estroma, creando un microambiente óptimo para el mantenimiento, la proliferación y diferenciación de las HSC y sus progenitores mediante cascadas de señalización^{15,8}. En los SMD se ha observado como la interacción entre las células hematopoyéticas y las MSC en el nicho medular conlleva a la reprogramación de las MSC por parte de las células hematopoyéticas¹⁶, induciendo a su senescencia¹⁷. A su vez, las señales inflamatorias de las MSC crean un estrés citotóxico que colabora en el desarrollo de la enfermedad¹⁸. Por último, el microambiente puede ser crucial en la evolución clonal y la transformación leucémica de los SMD.

1.2 CLASIFICACIÓN

La última actualización de la OMS¹ permite el diagnóstico de los SMD y sus subgrupos en función de las líneas afectas, las citopenias del paciente, el porcentaje de sideroblastos en anillo (SA), el porcentaje de blastos, la citogenética y las variantes patogénicas en *SF3B1* (Tabla 2).

Tabla 2. Parámetros diagnósticos de SMD según la clasificación de la OMS en el año 2017¹.

Entidad	Número de líneas displásicas	Número de citopenias ¹	% SA	% Blastos en MO/SP	Citogenética
SMD-DUL	1	1-2	<15 o <5 con <i>SF3B1</i> _{mut}	<5/<1, no BA	Cualquiera
SMD-DML	2-3	1-3	<15 o <5 con <i>SF3B1</i> _{mut}	<5/<1, no BA	Cualquiera
SMD-SA-DUL	1	1-2	≥15 o ≥5 con <i>SF3B1</i> _{mut}	<5/<1, no BA	Cualquiera
SMD-SA-DML	2-3	1-3	≥15 o ≥5 con <i>SF3B1</i> _{mut}	<5/<1, no BA	Cualquiera
SMD-del(5q)	1-3	1-2	Ausencia o aislados	<5/<1, no BA	del(5q) ²
SMD-EB-I	0-3	1-3	Ausencia o aislados	5-9/2-4, no BA	Cualquiera
SMD-EB-II	0-3	1-3	Ausencia o aislados	10-19/5-19 o BA	Cualquiera

¹Citopenia: hemoglobina <10g/dL, plaquetas <100·10⁹/L y/o neutrófilos <1.8·10⁹/L. ²Del(5q) aislada o con una alteración adicional excepto -7/del(7q). SA: sideroblastos en anillo, MO: médula ósea, SP: sangre periférica, mut: mutado, BA: Bastones de Auer.

Respecto a las alteraciones genéticas, en el subgrupo de SMD-del(5q) se acepta una segunda alteración citogenética excepto si se trata de la monosomía 7 o del(7q). En relación con el perfil mutacional, aunque se describen los genes más frecuentemente alterados, sólo se consideran las variantes patogénicas del gen *SF3B1* como criterio diagnóstico. El diagnóstico de SMD-SA viene definido por unos sideroblastos en anillo superiores al 5% y una alteración del gen *SF3B1*¹.

1.3 PRONÓSTICO Y EVOLUCIÓN

Los SMD engloban un grupo de neoplasias heterogéneo que presentan una evolución muy variable con una probabilidad alta de evolución a LMA. La mediana de supervivencia oscila entre los 5 meses en los SMD-EB-II, y los 70 meses en los SMD-SA-DUL¹⁹, de manera que es necesario un sistema de estratificación del riesgo.

En el año 2012 se publicó el IPSS revisado (IPSS-R, *Revised-International Prognostic Scoring System*), en el que se analizaron 7012 casos de SMD, encontrándose que las alteraciones citogenéticas eran las de mayor peso. Esta categoría pasó de 3 a 5 subgrupos, eliminando los casos con más del 20% de blastos y reconociendo el riesgo cuando existe un 3% de ellos²⁰ (Tabla 3).

Tabla 3. Parámetros categorías y puntuación del IPSS-R ²¹.

Parámetros IPSS-R	Categorías	Puntuación
Grupo citogenético de riesgo	Muy bueno	0
	Bueno	1
	Intermedio	2
	Malo	3
	Muy malo	4
Proporción de blastos en MO	≤2%	0
	>2-<5%	1
	5-10%	2
	>10%	3
Hemoglobina	≥10g/dL	0
	8-<10g/dL	1
	<8g/dL	1,5
Neutrófilos absolutos	≥0,8·10 ⁹ /L	0
	<0,8·10 ⁹ /L	0,5
Plaquetas	≥100·10 ⁹ /L	0
	50-100·10 ⁹ /L	0,5
	<50·10 ⁹ /L	1

El IPSS-R clasifica a los pacientes en 5 grupos con diferencias significativas en cuanto a la supervivencia global (SG) y libre de transformación a LMA (SLT) (Tabla 4). Debe calcularse al diagnóstico de la enfermedad y es válido prediciendo el pronóstico tras el tratamiento o tras el trasplante de progenitores hematopoyéticos (TPH)²².

Tabla 4. Grupos de riesgo establecidos en el IPSS-R y su SG y SLT²³.

Categorías	% Pacientes	Puntuación	Superv. (años)	Ev LMA (25%, años)
Muy bajo	19	0-1,5	8,8	-
Bajo	38	>1,5-3	5,3	10,8
Intermedio	20	>3-4,5	3	3,2
Alto	13	>4,5-6	1,6	1,4
Muy alto	10	>6	0,8	0,7

Las diferencias entre categorías son significativas con $p < 0,001$. Ev. LMA: tiempo de evolución a LMA del 25% de pacientes en años; Superv.: supervivencia mediana en años.

El *International Working Group for the prognosis of MDS* (IWG-PM) se encuentra actualmente desarrollando un nuevo IPSS-R molecular, donde además de los parámetros analíticos, morfológicos y citogenéticos se tendrá en consideración el perfil mutacional del paciente.

1.4 TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO

1.4.1 ESTUDIO MORFOLÓGICO

El hemograma y el frotis de sangre periférica son las primeras pruebas que hacen sospechar la existencia de un SMD, ante el hallazgo de citopenias y alteraciones displásicas en una o varias series hematopoyéticas, y tras descartar otras posibles causas.

El diagnóstico de SMD debe hacerse mediante el estudio citológico del aspirado de médula ósea (AMO), aunque es recomendable realizar también una biopsia de médula ósea para valorar la celularidad global, porcentaje de blastos y grado de fibrosis. La MO suele ser hipercelular o normocelular en la mayoría de los casos, aunque también puede ser hipocelular en los SMD hipoplásicos. Para establecer la existencia de displasia significativa de una serie, se debe observar en más del 10% de sus formas madurativas.

La tinción complementaria más usada es la Tinción de *Perls*, que permite la detección de gránulos de hemosiderina dispuestos alrededor del núcleo, característicos de los sideroblastos en anillo²⁴.

1.4.2 CITOMETRÍA DE FLUJO

La citometría de flujo (CMF) es una técnica que permite la evaluación, tanto cuantitativa como cualitativa, de las células hematopoyéticas mediante el análisis de la expresión de sus antígenos, tras la incubación de la muestra con anticuerpos específicos unidos a fluorocromos. A pesar de que el tener sólo un parámetro alterado no es específico de esta patología, el análisis multiparamétrico permite diferenciar una citopenia clonal de una de significado incierto con elevada especificidad y sensibilidad²⁵. Resulta una técnica de especial ayuda en aquellas muestras de baja

calidad, hipocelulares o con una citología no concluyente, con fibrosis medular o con citogenética no valorable.

El *International Flow Cytometry Working Group* en el seno de la *European LeukemiaNet* (ELN) describe los métodos estandarizados para el procesamiento de las muestras y las mínimas combinaciones de anticuerpos que deben ser usados para el estudio de las neoplasias hematológicas, y en especial el análisis de la displasia en los SMD^{26,27} (Tabla 5). El Grupo Español de SMD (GESMD)²⁸ ha realizado una serie de recomendaciones para la indicación de esta técnica concluyendo que es una herramienta aconsejada pero no obligatoria para el estudio de los SMD.

Tabla 5. Panel de marcadores recomendados por el *European LeukemiaNet Working Group*²⁷.

Población (MO)	Análisis Recomendado	Alteración
Progenitores mieloides y monocíticos	% de células nucleadas	% aumentado
	Expresión de CD45, CD34, CD13, CD33	Pérdida/disminución/aumento
	Expresión de CD117	Homogénea infra/sobreexpresión
	Expresión de CDHLA-DR	Pérdida/aumento
	Asincrónica expresión de CD11b, CD15	Presencia de marcadores de maduración
	Expresión de CD5, CD7, CD19, CD56	Presencia de marcadores de infidelidad de línea
Neutrófilos	% de células comparado con linfocitos y su SSC de la <i>ratio</i> vs SSC linfocitos	Disminuido
	Relación CD13 con CD11b, CD13 con CD16 y CD15 con CD10	Patrón alterado
Monocitos	% de células	Disminuido/aumentado
	Distribución de la maduración	Patrón inmaduro
	Relación HLA-DR con CD11b, CD36 con CD14	Patrón alterado
	Expresión CD13 y CD33	Homogénea infra/sobreexpresión
	Expresión CD56	Presencia de marcadores de infidelidad de línea
Progenitores B	Enumeración de la fracción de CD34 ⁺ total basada en CD45/CD34/SSC en combinación con CD10 o CD19	Disminuida o ausente
Eritroide	% células eritroides nucleadas	Aumentado
	Relación CD71 con CD235a	Patrón alterado
	Expresión CD71, CD36	Disminuido
	% precursores CD117 ⁺	Aumentado

MO: Médula ósea.

1.4.3 CITOGÉNICA

1.4.3.1 Cariotipo

El análisis por bandeo cromosómico permite el estudio global del genoma ya que es capaz de detectar alteraciones numéricas y estructurales como translocaciones, deleciones e inserciones de gran tamaño (mayores a 10Mb), con un bajo coste

económico. Sin embargo, se requieren células neoplásicas viables para su división. La interpretación del cariotipo, a veces con metafases de mala calidad, debe realizarse por personal con amplia experiencia.

Pronóstico

En el año 2012, se publicó una actualización del sistema de estratificación citogenético para SMD y LMA secundaria a SMD²⁹. En esta nueva clasificación, los pacientes se dividen en 5 grupos de riesgo según las alteraciones citogenéticas existentes, que se resumen en la Figura 1.

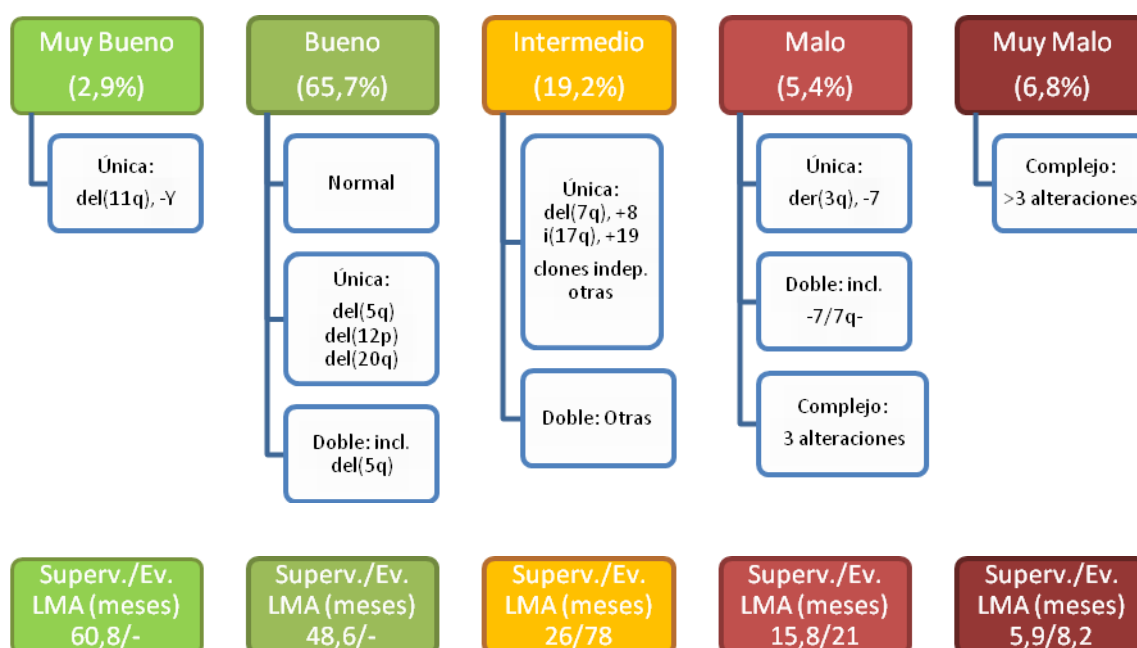


Figura 1. Clasificación citogenética de riesgo según las alteraciones citogenéticas presentes en el cariotipo del paciente y su media de supervivencia y de evolución a LMA²⁹. Los grupos presentan diferencias significativas ($p < 0,01$).

La citogenética convencional es obligatoria en el momento del diagnóstico y en la evolución de la enfermedad, siendo el parámetro con mayor peso en el IPSS-R (0 - 4 puntos). Además, permite optimizar la selección de la terapia necesaria así como evaluar la respuesta a la misma.

Alteraciones más frecuentes

Las alteraciones citogenéticas más frecuentes detectadas en los SMD son la del(5q)/-5, la del(7)/-7, la trisomía 8 y la del(20q), siendo las alteraciones que afectan al

cromosoma 7 las de peor pronóstico (Figura 2)³⁰. Sin embargo, los SMD pueden presentar una amplia variedad de alteraciones citogenéticas, como hallazgo único, junto a otra alteración o en el seno de un cariotipo complejo.

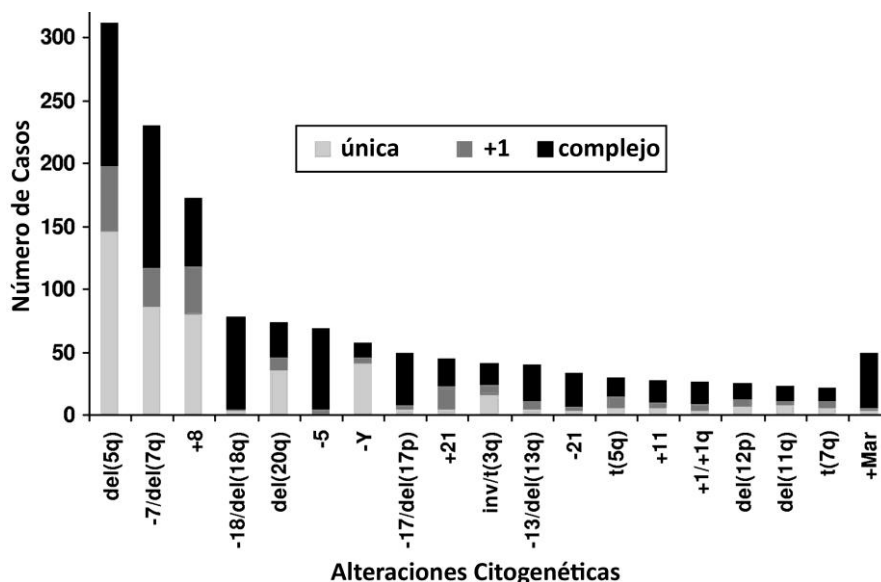


Figura 2. Alteraciones citogenéticas recurrentes descritas en una cohorte de 2124 pacientes de SMD según el contexto citogenético en el que se encuentran³¹.

La del(5q) es la alteración más común, detectándose en más de un 15% de los casos de nuevo diagnóstico, considerándose de buen pronóstico y con una lenta evolución a LMA. Además, también se encuentra en aproximadamente en el 30% de los casos con cariotipo complejo³¹. El síndrome del(5q), debido a su diseritropoyesis, presenta una dependencia transfusional elevada que puede disminuir con la administración de lenalidomida (LENA). Sin embargo, existe un subgrupo de pacientes que no responden a este fármaco, en los que se detectan variantes patogénicas del gen *TP53*³², y presentan un riesgo elevado de evolución de la enfermedad³³.

La monosomía 7 es la alteración más frecuente en los SMD secundarios a tratamientos alquilantes, detectándose hasta en la mitad de los casos, mientras que la delección del brazo largo del cromosoma 7 se encuentra en menos del 10%. La monosomía 7 presenta un pronóstico adverso con una rápida progresión a LMA (33 meses), resistencia al tratamiento y una supervivencia global corta (15 meses). Sin embargo, la delección 7q presenta un pronóstico más favorable con una progresión a LMA más lenta (78 meses) y una supervivencia mayor (20 meses).

Existen algunas alteraciones citogenéticas sugestivas de SMD que pueden resultar diagnósticas en pacientes en los que no se han podido demostrar rasgos definitorios de la enfermedad. Estas alteraciones son: -5/del(5q), -7/del(7q), del(9q), del(12p), i(17)(q10)/del(17p), -13/del(13q), t(1;3)(p36.3;q21.2), t(2;11)(p21;q23.3), t(3;21)(q26.2;q22.1), t(6;9)(p23;q34.1), t(11;16)(q23.3;p13.3), inv(3)(q21.3q26.2) e idic(X)(q13). Cabe destacar que entre ellas no se encuentran la trisomía 8, la nulisomía Y y la del(20q), debido a que éstas pueden detectarse en población sana o en varones de edad avanzada (nulisomía Y)³⁴.

1.4.3.2 Hibridación *in situ* fluorescente (FISH)

En la década de los 70 surgió la hibridación *in situ* fluorescente (FISH, del inglés *fluorescence in situ hybridization*)³⁵ que permite el estudio de un gen o región cromosómica concreta de manera rápida, sin la necesidad de usar células viables para su división. Esta técnica tiene una resolución entre 150-900kb, dependiendo del diseño de la sonda. Su principal desventaja es el coste elevado y la pérdida de la visión genómica global que proporciona el cariotipo. Se recomienda realizar la técnica de FISH en aquellos casos en los que no se han obtenido 20 metafases con cariotipo normal. En este supuesto, es recomendable proceder a realizar esta técnica para detectar las alteraciones más frecuentes: del(5q)/-5, del(7)/-7, trisomía 8 y del(20q). Debe tenerse en cuenta, que estos resultados aunque son informativos, no pueden emplearse para calcular el *score* del IPSS-R, ya que no se dispone de los datos del resto de los cromosomas del individuo.

1.4.4 SECUENCIACIÓN

1.4.4.1 Secuenciación de Sanger

La secuenciación de *Sanger* se basa en el método descrito por Frederick *Sanger* en 1977, en el que se añade al producto de la PCR (del inglés, *polymerase chain reaction*) junto a los dNTPs (del inglés, *deoxynucleotide triphosphates*), los ddNTPs (del inglés, *dideoxynucleotide triphosphates*) marcados con un fluorocromo. Los ddNTPs se incorporan a la secuencia en extensión y bloquean la cadena de ADN formada al carecer de grupo hidroxilo terminal. La colección completa de fragmentos de diferente tamaño que se obtiene se separa mediante una electroforesis capilar. Posteriormente

se analiza mediante un *software* específico que permite la obtención de un cromatograma y la secuencia en estudio. Su principal limitación, a parte del coste y el tiempo que conlleva, es la sensibilidad (15-20%).

En los SMD no es habitual usar esta técnica de manera rutinaria ya que existen un número elevado de genes susceptibles de resultar alterados. Una excepción son los genes *TP53* y *SF3B1*, que podrían analizarse mediante secuenciación *Sanger*. Las variantes patogénicas en el primero de ellos, aportaría un peor pronóstico y una posible falta de respuesta al tratamiento con LENA en pacientes con SMD del(5q)^{33,36,37}. Con respecto al gen *SF3B1*, podría estudiarse también mediante esta técnica en aquellos SMD que presenten más del 5% de sideroblastos en anillo para confirmar el diagnóstico de SMD-SA.

1.4.4.2 Secuenciación masiva

La secuenciación masiva (NGS, del inglés *next generation sequencing*) se basa en la secuenciación simultánea de millones de fragmentos de ADN. Esta técnica tiene una gran variedad de aplicaciones, desde la búsqueda de mutaciones conocidas (*Targeted NGS*) hasta una búsqueda no dirigida (genoma o exoma completo). Por otro lado, permite obtener una gran sensibilidad y reducir los costes y el tiempo de trabajo. Sin embargo, se necesita una infraestructura técnica costosa que requiere una especialización del personal, tanto para la realización de la técnica como para la interpretación de los datos.

1.4.4.3 Estudios de NGS en SMD y genes recurrentemente mutados

En el año 2013, Papaemmanuil y cols.³⁸ y Hafferlach y cols.³⁹ publicaron los primeros trabajos empleando la NGS en series amplias de pacientes con SMD. El grupo norteamericano estudió 111 genes relacionados con patologías mieloides en un grupo de 738 pacientes. El 74% (549/738) presentaron al menos una variante patogénica. Identificaron alteraciones en 43 genes, siendo los más frecuentes *SF3B1* (24%), *TET2* (22%) y *SRSF2* (14%). Además, demostraron como las variantes patogénicas de los genes relacionados con la maquinaria del *splicing* del ARN y la metilación de ADN ocurren de manera temprana, mientras que las vías de modificación de la cromatina y señalización tienen lugar en etapas posteriores. Se demostró, también, como las

variantes patogénicas en *SF3B1* están asociadas a los subtipos de SMD-SA y a una mayor supervivencia libre de progresión a leucemia³⁸.

En el estudio de Hafferlach y cols.³⁹ se analizaron 104 genes en 944 pacientes, obteniendo unos resultados similares a los descritos por Papaemmanuil y cols.³⁸ (Figura 3).

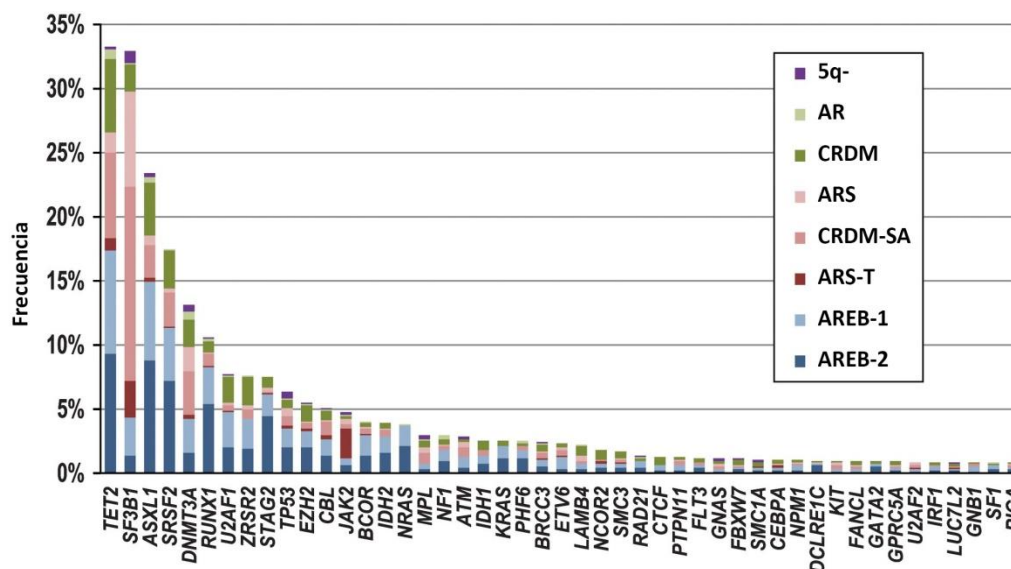


Figura 3. Frecuencia de las variantes patogénicas identificadas por NGS en 944 pacientes, según su subtipo de SMD establecido por la OMS³⁹.

Importancia pronóstica

Ambos trabajos demostraron que a mayor número de variantes patogénicas, la supervivencia global se ve disminuida y el riesgo de transformación a LMA aumenta^{23,38,39}. Hafferlach y cols. propusieron un modelo de predicción de pronóstico usando el perfil mutacional de 14 genes (*ASXL1*, *CBL*, *ETV6*, *EZH2*, *KRAS*, *LAMB4*, *NF1*, *NPM1*, *NRAS*, *PRPF8*, *RUNX1*, *STAG2*, *TET2* y *TP53*). Además de los parámetros incluidos en el IPSS-R³⁹, observaron una diferencia significativa entre los diferentes grupos de riesgo: bajo, intermedio, alto y muy alto.

Vías y genes más frecuentemente alteradas

En el año 2017, el grupo español de SMD (GESMD) publicó las guías de aplicación clínica de la secuenciación masiva en SMD, en las que se incluían recomendaciones

para la elección de plataformas, el análisis e interpretación de variantes, junto con la incidencia y pronóstico de los genes relacionados con esta patología⁴⁰.

Los genes alterados más frecuentemente en los SMD se pueden agrupar en diferentes categorías según la función biológica que ejercen en la célula. Las vías que se encuentran más frecuentemente alteradas son las que se encuentran compuestas por los factores de *splicing* y los genes relacionados con la regulación de la metilación del ADN (Figura 4).

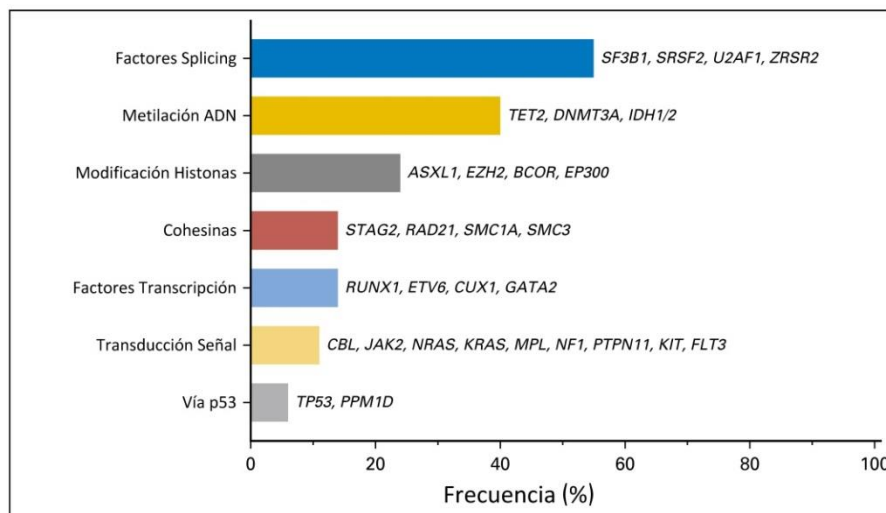


Figura 4. Frecuencia mutacional de las categorías funcionales y genes más relevantes en pacientes con SMD⁴¹.

- Factores de *Splicing*

SF3B1 (Splicing Factor 3b Subunit 1)

Este gen está situado en la banda citogenética 2q33.1 y codifica para la subunidad 1 del complejo proteico del factor de *splicing* 3b. Este complejo se une a 3' del *splice site* del pre-ARNm, junto a U2snRNP, formando el complejo del *splicing* A. Las variantes patogénicas de este gen suelen ser *missense*, heterocigotas, funcionalmente deletéreas y la mayoría se concentran en los *hotspots* R625 y K700 (exones 14 y 15). *SF3B1* se encuentra afecto en el 81% de los pacientes con SMD-SA y se asocia a una mayor supervivencia global y a una incidencia menor de progresión de la enfermedad⁴². Estos pacientes pueden presentar también alteraciones en genes de la metilación del ADN. Por otro lado, en un subgrupo de pacientes con *SF3B1* y *TP53* alterados, se ha descrito un peor pronóstico de la enfermedad⁴².

SRSF2 (Serine and Arginine Rich Splicing Factor 2)

Situado en la banda citogenética 17q25.1, este gen codifica para una proteína que contiene un motivo de unión al ARNm y otro de unión a proteínas del *spliceosoma* con regiones ricas en serinas y argininas. Las variantes patogénicas de *SRSF2*, concentradas en el *hotspot* P95, son más frecuentes en la leucemia mielomonocítica crónica (LMMC) (50%)⁴³ que en los SMD (15-20%). Causan la formación de transcritos alternativos e inestabilidad genómica⁴⁴. En los SMD, se asocian a pacientes de edad avanzada y a una menor supervivencia global⁴⁵, detectándose al inicio de la enfermedad y junto a alteraciones en los genes *RUNX1*, *ASXL1*, *IDH2*^{38,45} y *TET2*³⁹ en la progresión.

ZRSR2 (Zinc Finger CCCH-Type, RNA Binding Motif And Serine/Arginine Rich 2)

Este gen está situado en la banda citogenética Xp22.2 y codifica para una proteína que se asocia con el snRNP (del inglés, *small nuclear ribonucleoprotein*) U2 formando el heterodímero que permite el reconocimiento del 3' *splice site* en el pre-ARNm durante la formación del *spliceosoma*. Las alteraciones en *ZRSR2*, de forma aislada, se han asociado a pacientes con anemia macrocítica sin leucopenia, trombocitopenia ni incremento de blastos⁴⁶. Las variantes patogénicas en este gen, mayoritariamente *non-sense* y *frameshift*, se distribuyen a lo largo de toda la región codificante, localizándose en las zonas donadoras/receptoras de *splicing*⁴⁴. Se han asociado a alteraciones en *TET2*³⁹, con un significado clínico incierto.

U2AF1 (U2 Small Nuclear RNA Auxiliary Factor 1)

U2AF1, también denominado *U2AF35*, está localizado en la banda citogenética 21q22.3, codifica para una pequeña subunidad que forma al factor U2 y juega un papel importante en el *splicing*, ya que interactúa entre el complejo del *spliceosoma* y el ARNm. Las variantes patogénicas se concentran en dos *hotspots*, S34 y R156-Q157, y se hipotetiza que causan la desregulación del ciclo celular suprimiendo la proliferación e induciendo a la apoptosis⁴⁴. *U2AF1* se encuentra mayoritariamente afecto en SMD sin SA, tiene más incidencia en adultos jóvenes^{47,48} y se asocia a variantes patogénicas en *ASXL1*^{39,49} y *DNMT3A*⁴⁹, y a pacientes con la alteración citogenética del(20q)⁵⁰. Según el codón afecto, se relaciona con diferentes características clínicas, como trombocitopenia y menor respuesta al tratamiento con azacitidina (AZA)⁵¹ en

pacientes con *U2AF1*^{S34}, y anemia en pacientes con *U2AF1*^{R156,Q157}⁴⁷. Su significado clínico se encuentra en discusión, ya que en algunos trabajos se asocia con una menor supervivencia global^{47,48}, mientras que en otros no causa variación en el pronóstico^{44,49}.

- **Metilación del ADN**

TET2 (Tet Methylcytosine Dioxygenase 2)

Situado en la banda citogenética 4q24, este gen codifica para una metilcitosa dioxigenasa que cataliza la conversión de la metilcitosa a 5-hidroximetilcitosa, desmetilando las islas CpG y activando la transcripción génica. *TET2* se encuentra alterado en un 15-27% de los pacientes con SMD⁴¹, con variantes de tipo *missense*, *non-sense* y *frameshift* a lo largo de todo el gen. Las variantes patogénicas en *TET2* se asocian a edad avanzada y a hematopoyesis clonal, pudiendo ser iniciadoras del proceso neoplásico⁶ y con un efecto pronóstico controvertido. Mientras que hay grupos que no describen un efecto en la supervivencia global ni en la respuesta a agentes hipometilantes^{52,53}, hay otros que sí las asocian con una mayor respuesta a AZA⁵⁴. Sin embargo, también se ha descrito un impacto negativo en la supervivencia de los pacientes con estas variantes tras el TPH⁵⁵. Las variantes patogénicas en *TET2* son mutuamente excluyentes con las del gen *IDH2*³⁸, aunque si se correlacionan positivamente con los genes *SRSF2* y *ZRSR2* en la LMMC³⁹.

DNMT3A (DNA Methyltransferase 3 Alpha)

Este gen codifica para una ADN metiltransferasa que permite la metilación *de novo* de las citosinas de las islas CpG y está situado en la banda citogenética 2p23.3. Las alteraciones en este gen tienen una frecuencia del 12-18% en los SMD⁴¹ y también se relacionan, como *TET2*, a pacientes con edades avanzadas y a hematopoyesis clonal⁶. Las variantes patogénicas en *DNMT3A* se asocian a SMD-SA, a un mayor riesgo de evolución a LMA⁵⁶ y a una menor supervivencia global y tras TPH⁵⁵. El codón R882 es el más frecuentemente alterado, y las variantes patogénicas en este gen coexisten con las de *IDH2* y *SF3B1*, conformando un subgrupo con peor pronóstico y menor tiempo de progresión a LMA⁵⁷.

IDH1/2 (*Isocitrate Dehydrogenase 1/2*)

IDH1/2 están situados en las bandas citogenéticas 2q34 (*IDH1*) y 15q26.1 (*IDH2*), codifican para la enzima isocitrato deshidrogenasa citoplasmática y mitocondrial, respectivamente, y permiten la conversión del isocitrato a α -cetoglutarato en el ciclo de Krebs. Las alteraciones en estos genes conllevan a la conversión del isocitrato a D-2-hidroxioglutarato, causando el bloqueo de otros genes epigenéticos, la desregulación de la transcripción y el desarrollo de la enfermedad⁵⁸. Las variantes patogénicas más frecuentes ocurren en los *hotspots* R132 (*IDH1*) y R140-R172 (*IDH2*). En el momento del diagnóstico, se detectan un 5% de variantes en *IDH1/2*, la mayoría en *IDH2*^{R140}, mientras que en estadios más avanzados de la enfermedad son más frecuentes, como ocurre en los SMD-EB y en la transformación a LMA, dónde se detectan un 11%, sugiriendo un papel en la progresión de la enfermedad⁵⁹. Las variantes patogénicas en *IDH1/2*, que son mutuamente excluyentes, se asocian a pacientes con citogenética normal o de riesgo intermedio. No se observan en pacientes con del(5q) y son raras en pacientes con alteraciones citogenéticas en el cromosoma 7 o con cariotipos complejos⁵⁹. Además, se asocian a pacientes con edad avanzada y con recuentos de plaquetas altos. Estas variantes coexisten con mutaciones en *DNMT3A*, *ASXL1* y *SRSF2*⁶⁰, siendo mutuamente excluyentes con *TET2*⁵⁹. Mientras que *IDH2*^{R140} no se ha asociado a un peor pronóstico, las demás variantes patogénicas sí confieren una supervivencia global más corta y un mayor riesgo a progresión a LMA^{60,61}.

- **Modificación de histonas**

ASXL1 (Additional Sex Combs-like 1)

Este gen, situado en la banda citogenética 20q11.21, codifica para una proteína de unión a la cromatina de la familia *Polycomb* y está involucrado en los procesos epigenéticos mediante la interacción del C terminal de su homodominio situado en el exón 12. Por ello, la mayor parte de las variantes patogénicas, *non-sense* o *frameshift*, se encuentran en ese exón, siendo la c.1934dupG (p.646WfsX12) la más común en neoplasias mieloides⁶², detectándose en el 20% de los SMD⁴¹. Las alteraciones en *ASXL1* se asocian a pacientes de edad avanzada y con *ICUS*, leucocitosis y blastos en SP, con un impacto negativo en la supervivencia global^{38,63}. Las variantes en *ASXL1* suelen coexistir con las de otros genes, a excepción de las de *SF3B1*, *DNMT3A* e *IRF1*³⁹.

EZH2 (Enhancer of Zeste 2 Polycomb Repressive Complex 2 Subunit)

EZH2 está situado en la banda 7q36.1. Este gen codifica para una proteína de la familia *Polycomb*, catalizando la adición de grupos metilo en la histona H3 y participando en la represión transcripcional. Las alteraciones de este gen pueden observarse en otras neoplasias, y en los SMD tienen una frecuencia del 5%⁴¹ asociándose a un peor pronóstico²³. Las variantes patogénicas de *EZH2*, de origen primario⁶⁴, pueden coexistir con las de los genes *RUNX1*, *ASXL1* y *TET2*, relacionadas con la progresión de la enfermedad cuando coexisten con este último gen⁶⁵. En pacientes con subtipos de SMD de alto riesgo, se asocian a un mayor riesgo de transformación a LMA⁶⁶.

- Componentes de cohesinas:

Son los responsables de la cohesión de las cromátidas hermanas y están involucrados en la reparación y la transcripción del ADN. Los genes más comúnmente afectados en las neoplasias mieloides son *STAG2*, *RAD21*, *STAG1*, *SMC1A* y *SMC3*. Son variantes patogénicas mutuamente excluyentes que causan una pérdida de función, debido a variantes de tipo *non-sense* o *frameshift*. En SMD de subtipos de bajo riesgo presentan una frecuencia del 11%, que aumenta hasta el 17% en los de alto riesgo⁴¹, asociándose a un peor pronóstico.

- Factores de transcripción

RUNX1 (Runt Related Transcription Factor 1)

Este gen codifica para la subunidad α del complejo CBF (del inglés, *Core Binding Factor*). Se localiza en la banda citogenética 21q22.12, y está involucrado en el desarrollo normal de la hematopoyesis. *RUNX1* puede estar alterado mediante reordenamientos cromosómicos o mediante variantes génicas, produciendo una proteína truncada o aberrante. Las variantes patogénicas en este gen tienen una frecuencia del 5-10% en SMD^{23,39}, aumentando hasta más del 20% en los subtipos de SMD de alto riesgo y en las LMA secundarias a SMD. Por lo tanto, *RUNX1* se asocia a patología de alto riesgo, a una menor supervivencia global y a un mayor riesgo de progresión a LMA, incluso si existen variantes en clones minoritarios³⁸. También se ha asociado a pacientes con trombocitopenia, exceso de blastos, deleciones o

monosomías del cromosoma 7, y a variantes patogénicas de genes de la vía RAS asociadas a la transformación leucémica⁶⁷.

BCOR (BCL6 Corepressor)

BCOR está situado en la banda citogenética Xp11.4, y codifica para una proteína que forma parte del complejo *Polycomb* actuando de represor de *BCL6*. Se han detectado variantes patogénicas de este gen en diferentes procesos neoplásicos con una frecuencia en los SMD del 4,2%, asociándose con un peor pronóstico de la enfermedad⁶⁸.

ETV6 (ETS Variant 6)

Este gen codifica para un factor de transcripción que actúa como represor de la expresión génica y está situado en la banda citogenética 12p13.2. Este gen se encuentra reordenado y delecionado en neoplasias mieloides, pero también mutado en un 2% de casos, asociándose a la monosomía del cromosoma 7⁵⁰ y a un peor pronóstico de la enfermedad²³.

SETBP1 (SET Binding Protein 1)

Se localiza en la banda citogenética 18q12.3, y codifica para una proteína nuclear que interactúa con el gen represor de tumor *PP2A*, teniendo una implicación en la proliferación celular. Las variantes patogénicas en este gen tienen una frecuencia entre el 2-5% en los SMD⁴¹, y se asocian a leucocitosis, isocromosoma 17q⁶⁹, monosomía 7, alteraciones en *ASXL1*, *EZH2* y *SRSF2* y a un peor pronóstico de la enfermedad⁷⁰.

- *Transducción de señal*

Vía RAS

NRAS, *KRAS*, *PTPN11*, *CBL*, *NF1* y *KIT* conforman esta vía y están alterados en un 5-10% de los pacientes con SMD^{23,41}. Estas GTPasas están relacionadas con la regulación de la proliferación celular, la supervivencia y la diferenciación. Las variantes patogénicas en estos genes, se asocian a una trombocitopenia severa, exceso de blastos y un peor pronóstico²³. Además, se relacionan con la evolución clonal de los SMD y a un mayor riesgo de transformación a LMA, a pesar de detectarse en clones minoritarios^{71,72}.

Vía tirosina quinasa

Los genes que conforman esta vía no son frecuentes en los SMD, aunque sí tienen mayor frecuencia en LMA (*FLT3*) y en SMD/SMP (*JAK2*). La variante *JAK2*^{V617F} se detecta en un 6% de pacientes con del(5q)⁷³.

- Vía *TP53* (Respuesta al daño celular)

TP53 está situado en la banda citogenética 17p13.1. Codifica para una proteína supresora de tumores que contiene dominios de unión al ADN para su activación transcripcional. Responde en situaciones de estrés celular regulando la expresión de diferentes genes, causando el arresto celular, apoptosis, senescencia, u otros cambios en el metabolismo.

Se han descrito alteraciones a lo largo de este gen en una gran variedad de procesos neoplásicos, somáticos y germinales, que alteran la supervivencia y la proliferación celular. En los SMD²³, la frecuencia de las variantes patogénicas de *TP53* es del 8% y no suelen presentarse junto a otras mutaciones. Se asocian a cariotipos monosómicos y complejos, exceso de blastos y trombocitopenia. Esto confiere al paciente un pronóstico muy adverso²³ y un mayor riesgo de transformación a LMA⁵⁰. Se ha definido un subgrupo de alto riesgo en pacientes con del(5q) y *TP53* afecto, que conlleva una resistencia al tratamiento con LENA y la progresión de la enfermedad³³. Además, las variantes patogénicas en *TP53* se asocian a un mayor riesgo de recaída tras el TPH, lo que conlleva una menor supervivencia⁵⁵.

1.5 TRATAMIENTO

El tratamiento estándar varía en función del subtipo, de bajo o de alto riesgo. Los pacientes con un SMD de bajo riesgo pueden beneficiarse de los estimuladores de la eritropoyetina (EPO), de agentes inmunomoduladores (lenalidomida en el caso de SMD-del5q) y de inmunosupresores (corticoides, ciclosporina A). Sin embargo, los pacientes con SMD de alto riesgo precisan de tratamientos más agresivos con agentes hipometilantes, AZA y decitabina (DEC), de quimioterapia intensiva o a bajas dosis y de TPH⁷⁴. La eficacia de los agentes hipometilantes radica en la naturaleza epigenética de los SMD y en la presencia de mutaciones en los genes relacionados con la metilación

del ADN, que actúan de biomarcadores para los inhibidores de la ADN metiltransferasa.

1.5.1 NUEVAS TERAPIAS

Actualmente, existen numerosas moléculas que están siendo estudiadas dentro de ensayos clínicos. Los nuevos fármacos y moléculas se detallan en la Tabla 6.

Tabla 6. Dianas terapéuticas en SMD y moléculas en desarrollo.

DIANA TERAPÉUTICA	FÁRMACO	MECANISMO DE ACCIÓN	CÓDIGO ENSAYO CLÍNICO
Variantes/sobreexpresión en mecanismos de reparación de ADN	Otaparib, Talazoparib, Veliparib, Temozolomida	Muerte celular en ausencia de un HRD funcional	NCT02878785, NCT01139970
Sobreexpresión de telomerasa	Imetelstat	Inhibidor de la telomerasa	NCT02598661
Variantes en <i>TP53</i> o alteraciones en MDMX/MDM2	ALRN-6924	Reactiva p53 a través del antagonismo con MDMX/MDM2	NCT02909972
	APR-246	Restituye actividad p53	NC03931291
Sobreexpresión de BCL-2	Venetoclax	Proapoptótico, disminuye expresión de BCL-2	NCT02942290
Variantes patogénicas en <i>IDH1/2</i>	Ivosidenib	Inhibidor mutaciones <i>IDH1</i>	NCT02074839
	Enasidenib	Inhibidor mutaciones <i>IDH2</i>	NCT01915498
Variantes patogénicas en <i>ASXL1</i> , <i>DNMT3A</i> , <i>TET2</i>	5-Azacitidina	Inhibidor DNMT	NCT03019003
	ASTX727 decitabina	Inhibidor DNMT	NCT03306264
	Guadecitabina	Inhibidor DNMT	NCT02907359
Alteraciones en histona desacetilasas	Mocetinostat, Pracinostat, Vorinostat, Entinostat	Inhibidor histona desacetilasa	NCT02018926, NCT01873703, NCT01522976
Alteraciones en Pim quinasa / PLK-1	Volasertib	Inhibidor PLK-1	NCT01957644
Alteraciones en MEK1/2	Binimetinib	Inhibidor de RAS y MEK	NCT01449058
Variantes patogénicas en RAS	Rigosertib	Inhibición de la vía PI3K/AKT	NCT01926587 NCT01241500
Alteraciones en vía Hedgehog	Sonidegib	Inhibición de la señalización Hh	NCT02129101
Alteraciones en vía BET	Mivebresiniv	Inhibidor de MYC, interrumpe la remodelación de la cromatina	NCT02391480
Variantes patogénicas en <i>SF3B1</i> , <i>U2AF1</i> , <i>SRSF2</i> , <i>ZRSR2</i>	H3B-8800	Modulador del complejo SF3b	NCT02841540
Alteraciones en PD-1/PD-L1	Ipilimumab	Inhibidor CTLA-4	NCT02530463
	Atezolizumab	Inhibidor PD-L1	NCT02508870
	Durvalumab, Pembrolizumab	Inhibidor PD-1	NCT02281084 NCT03094637
Efectos en TGF- β	Luspatercept	Unión a GDF-11	NCT02631070
	Sotatercept	Unión a GDF-11	NCT01736683

Adaptación de Aleshin y cols.⁷⁵ HRD: del inglés, Homologous Recombination Deficiency; Hh: Hedgehog.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

Los SMD son un conjunto de neoplasias mieloides clonales heterogéneas, que se clasifican en diferentes subtipos con características comunes. Los parámetros analíticos, la citología y el cariotipo han sido hasta ahora las herramientas utilizadas para establecer el pronóstico de los pacientes con SMD. Sin embargo, estas pruebas diagnósticas tienen limitaciones. El cariotipo, categoría con mayor puntuación en el IPSS-R, es normal en el 50% de los casos aproximadamente y puede no ser informativo en el 20-30% de ellos. La hipótesis de este trabajo es que el estudio del perfil mutacional de un conjunto de genes, junto con las técnicas convencionales, podría ayudar a realizar una estimación del pronóstico y riesgo de progresión a LMA de forma más precisa^{23,38,39}.

En base a lo anteriormente expuesto, se plantearon los siguientes objetivos:

1. Caracterización genética de 106 pacientes con SMD mediante técnicas de secuenciación masiva dirigida:
 - Comparar la utilidad de las técnicas de citogenética convencional y de secuenciación masiva para la detección de alteraciones genéticas.
 - Analizar la asociación entre el perfil mutacional de los pacientes y sus características clínico-biológicas.
 - Evaluar el impacto pronóstico del perfil mutacional en términos de supervivencia global y de transformación a LMA.
2. Caracterización genética de 23 pacientes con SMD en diferentes etapas a lo largo de su evolución:
 - Analizar los mecanismos de evolución clonal.
 - Identificar posibles parámetros, clínicos o genéticos, asociados a riesgo de progresión a LMA.
 - Identificar patrones fenotípicos asociados a cambios genotípicos.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. MATERIAL

1.1 PACIENTES DE LA COHORTE

Se llevó a cabo un estudio observacional y retrospectivo en el que se incluyeron 106 pacientes diagnosticados de SMD entre los años 2014 y 2018. De estos pacientes se pudo preservar el excedente de la muestra de MO extraída para la realización de las pruebas diagnósticas, que pasó a formar parte del biobanco del Hospital Fundación Jiménez Díaz. Los pacientes procedían de cuatro Hospitales Universitarios de la Comunidad de Madrid: Fundación Jiménez Díaz (Madrid), Rey Juan Carlos (Móstoles), Infanta Elena (Valdemoro) y General de Villalba (Villalba).

En todos los casos se obtuvo el consentimiento informado de los pacientes siguiendo los criterios de la Declaración de Helsinki. El estudio fue aprobado por el Comité Ético del Hospital Universitario Jiménez Díaz (CEIM-IISFJD).

1.1.1 VARIABLES CLÍNICAS

Se revisaron las historias clínicas de los pacientes, registrando sus características clínicas y biológicas así como su evolución. Estas variables se muestran en la Tabla 7.

2. MÉTODOS

2.1 CITOGENÉTICA CONVENCIONAL

Se realizó la técnica de cariotipo de todos los pacientes incluidos para el estudio siguiendo las recomendaciones de las guías internacionales para el estudio del cariotipo en neoplasias hematológicas⁷⁶.

El análisis de los portaobjetos se realizó en microscopios ópticos (Nikon Eclipse 80i, Nikon, Tokio, Japón) mediante rastreo manual o de forma automatizada con la plataforma Metafer (MetaSystems, Newton, Estados Unidos). Las metafases obtenidas se analizaron mediante la plataforma de cariotipado Ikaros (MetaSystems). Se analizaron 20 metafases de cada uno de los pacientes o 10 metafases si se detectó una

alteración clonal. La fórmula cromosómica se estableció siguiendo la nomenclatura internacional establecida por el ISCN 2013/2016⁷⁷.

Tabla 7. Definición de las variables incluidas en el estudio estadístico.

Variables	Definición
Edad	Edad del paciente (<75 años vs ≥75 años)
Sexo	Mujer/Hombre
Subtipos de SMD	Subtipos de SMD establecidos en la última clasificación de la OMS ¹
Subtipo de riesgo	Subtipos de bajo riesgo: SMD-SA, SMD-DUL, SMD-DML, SMD-del5q, SMD-i Subtipos de alto riesgo: SMD-EB-I y II
Anemia	Establecida como valores de hemoglobina < 10g/dL
Neutropenia	Establecida como valores de neutrófilos < 1,8·10 ⁹ /L
Trombopenia	Establecida como valores de plaquetas < 100·10 ⁹ /L
VCM	Volumen corpuscular medio (fl)
Blastos en MO	Recuento de blastos mediante el estudio citológico (<10% vs ≥10%)
Cariotipo	Cariotipo informativo: - Cariotipo normal: análisis de 20 metafases normales - Cariotipo alterado: presencia de alteración en dos metafases si se trata de un anomalía estructural o ganancia de un cromosoma, y en tres metafases si se trata de una monosomía Cariotipo no informativo: análisis de <20 metafases
Cariotipo complejo	Cariotipo con ≥ 3 alteraciones citogenéticas
IPSS-R	Subtipos de IPSS-R
IPSS-R bajo y alto riesgo	Subtipo IPSS-R bajo: subtipos con puntuación ≤3,5 Subtipo IPSS-R alto: >3,5
Tratamiento inicial	Primer tratamiento recibido
Nº de tratamientos	Número de tratamientos recibidos desde el diagnóstico hasta el fin del seguimiento
Nº de variantes patogénicas	Número de variantes patogénicas/probablemente patogénicas/de significado incierto con VAF>2%
Genes	Genes con variantes patogénicas detectadas con ≥10% de frecuencia en la serie con excepción de genes con gran implicación clínica (<i>IDH1/2</i>)
Adquisición de variantes patogénicas	Variantes patogénicas/probablemente patogénicas/de significado incierto detectadas en una segunda muestra con ≥1% de VAF
Enfermedad estable	Respuesta parcial no alcanzada y no progresión en <8 meses ⁷⁸
Supervivencia global	Tiempo transcurrido desde la fecha del diagnóstico del SMD a la fecha de <i>exitus</i> o último seguimiento, en meses
Supervivencia libre de transformación a LMA	Tiempo transcurrido desde la fecha de diagnóstico a la fecha en la que se documentó la evolución a LMA

MO: médula ósea, VAF: *variant allele fraction*.

2.2 HIBRIDACIÓN *IN SITU* FLUORESCENTE

Se realizó la técnica de hibridación *in situ* fluorescente (FISH) en aquellos pacientes en los que no se pudieron obtener metafases para el estudio citogenético, cuando éstas

no fueron de una calidad óptima, el número era insuficiente, o para confirmar alteraciones que se sugerían en el cariotipo obtenido. Los detalles de las sondas comerciales que se utilizaron se recogen en la Tabla 8.

Se analizaron las muestras mediante un microscopio de fluorescencia Nikon Eclipse 80i con filtros para DAPI, *Texas-Red* + *Green-FITC* (filtro doble), *Texas-Red*, *Green-FITC* y *Blue-Aqua*. Se realizó un conteo de 200 células.

Tabla 8. Sondas comerciales utilizadas en los estudios de FISH.

	Sonda de FISH	Referencia	Sensibilidad
-5/del5q	<i>Vysis LSI EGR1/D5S23, D5S721 Dual Color Probe Kit</i> (AbbottMolecular, Chicago, Estados Unidos)	#08L68-020	5%
-7/del7q	<i>Vysis D7S486/CEP7 FISH Probe Kit</i> (AbbottMolecular)	#05N07-020	5%
+8	<i>Vysis CEP 8 SpectrumOrange Direct Labeled Fluorescent DNA Probe kit</i> (AbbottMolecular)	#07J22-008	10%
del20q	<i>Vysis D20S108 FISH Probe Kit</i> (AbbottMolecular)	#05N02-020	10%
delTP53	<i>Vysis TP53/CEP17 FISH Probe kit</i> (AbbottMolecular)	#05N56-020	5%

Del: delección; FISH: *fluorescent in situ hybridization*

2.3 EXTRACCIÓN DE ADN

La extracción de ADN se realizó de manera manual mediante el kit *QIAamp DNA minikit* (Qiagen, Hilden, Alemania), según las condiciones del fabricante.

La cuantificación del ADN genómico extraído se realizó en el espectrofotómetro NanoDrop™ 2000/c (ThermoFisher Scientific, Waltham, Estados Unidos). Todas las muestras debían presentar una *ratio* A_{260}/A_{280} y A_{260}/A_{230} superior a 1,8. Por otra parte, para analizar la integridad del ADN se realizó una electroforesis en un gel de agarosa al 1%.

2.4 SECUENCIACIÓN SANGER

2.4.1 SECUENCIACIÓN SANGER DE TP53 EN PACIENTES CON del(5q)

Se analizaron los exones 4, 5, 6, 7, 8 y 9 del gen *TP53* mediante la secuenciación tipo *Sanger* en aquellos pacientes diagnosticados de SMD-del(5q) (n=7). Se realizaron dos reacciones en cadena de la polimerasa (PCR), una para la amplificación del exón 4 (319 pb de tamaño) y otra para la amplificación de los exones del 5-9 (1,9 kb de tamaño).

A continuación, se confirmó la presencia de producto amplificado mediante electroforesis en un gel de agarosa al 3% y se purificaron los productos obtenidos mediante *ExoSAP-IT™ for PCR Product Clean-up* (Applied Biosystems, Foster City, Estados Unidos), siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante.

Posteriormente, se realizaron las reacciones de secuenciación utilizando el *BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit* (Applied Biosystems) y se secuenciaron los productos obtenidos en un secuenciador ABI3130 (Applied Biosystems). Las secuencias se analizaron mediante el software de análisis Glass⁷⁹ y las variantes se estudiaron consultando las bases de datos de *IARC TP53 Database*⁸⁰ (www.p53.iarc.fr) y *COSMIC*⁸¹ (www.cancer.sanger.ac.uk).

2.4.2 SECUENCIACIÓN SANGER DE *ASXL1*

Se realizó la secuenciación tipo *Sanger* de los exones 11 y 12 de *ASXL1* en 78 pacientes. Se realizaron tres PCRs para el estudio de los exones, una para el exón 11 (340 pb de tamaño) y 2 para el exón 12 (561 pb y 558 pb de tamaño).

A continuación, se demostró la presencia de producto amplificado mediante la electroforesis en un gel de agarosa al 3% y se purificaron los productos obtenidos mediante *ExoSAP-IT™ for PCR Product Clean-up* (Applied Biosystems). Posteriormente, se realizó la reacción de secuenciación mediante *BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit* (Applied Biosystems). La interpretación de los resultados se hizo de manera manual.

2.5 SECUENCIACIÓN MASIVA

La técnica de secuenciación masiva (NGS) se llevó a cabo mediante un panel customizado de Ion Torrent (ThermoFisher) y el panel comercial “Myeloid Solution by SOPHIA GENETICS” (SOPHIA GENETICS, Saint Sulpice, Suiza). El diseño del panel del Ion Torrent no incluyó el exón 12 del gen *ASXL1*. Para solventar esta limitación todos los pacientes analizados mediante este panel se estudiaron por secuenciación *Sanger*. El listado de genes incluidos en cada uno de los paneles empleados en el desarrollo de este trabajo se encuentra resumido en la Tabla 9.

Tabla 9. Genes incluidos en los paneles utilizados y los exones cubiertos de cada gen entre paréntesis.

Panel ThermoFisher	Panel SOPHIA GENETICS
-	<i>ABL1</i> (4-9)
<i>ASXL1</i> (8,9,10,11)	<i>ASXL1</i> (9,11,12,14)
<i>BCOR</i>	-
<i>BRAF</i>	<i>BRAF</i> (15)
-	<i>CALR</i> (9)
<i>CBL</i> (8, 9)	<i>CBL</i> (8, 9)
<i>CDKN2A</i>	-
<i>CEBPA</i>	<i>CEBPA</i>
-	<i>CSF3R</i>
<i>DNMT3A</i>	<i>DNMT3A</i>
<i>ETV6</i>	<i>ETV6</i>
<i>EZH2</i>	<i>EZH2</i>
<i>FLT3</i> (13-15,20)	<i>FLT3</i> (13-15,20)
<i>GNAS</i>	-
-	<i>HRAS</i> (2,3)
<i>IDH1</i> (3, 4)	<i>IDH1</i> (4)
<i>IDH2</i> (4)	<i>IDH2</i> (4)
<i>JAK2</i> (11-15)	<i>JAK2</i>
<i>KIT</i> (2,8-12,17)	<i>KIT</i> (2,8-11,13,17,18)
<i>KRAS</i> (2-4)	<i>KRAS</i> (2,3)
<i>LUC7L2</i>	-
<i>MPL</i> (10)	<i>MPL</i> (10)
<i>NF1</i>	-
<i>NPM1</i> (10)	<i>NPM1</i> (10,11)
<i>NRAS</i> (1-4)	<i>NRAS</i> (2,3)
<i>PHF6</i>	-
<i>PTPN11</i>	<i>PTPN11</i> (3,7-13)
<i>RAD21</i>	-
<i>RPS14</i> (2-5)	-
<i>RUNX1</i>	<i>RUNX1</i>
<i>SETBP1</i> (4)	<i>SETBP1</i> (4)
<i>SF1</i>	-
<i>SF3A1</i>	-
<i>SF3B1</i> (10-16)	<i>SF3B1</i> (10-16)
<i>SMC3</i>	-
<i>SPARC</i>	-
<i>SRSF2</i> (1)	<i>SRSF2</i> (1)
<i>STAG2</i>	-
<i>TET2</i>	<i>TET2</i>
<i>TP53</i> (3-11)	<i>TP53</i>
<i>U2AF1</i> (1-6)	<i>U2AF1</i> (2,6)
<i>WT1</i> (6-10)	<i>WT1</i> (6-10)
<i>ZRSR2</i>	<i>ZRSR2</i>

La calidad de las carreras y de las muestras analizadas se evaluó mediante el parámetro *Phred quality score (Qscore)*. Este parámetro representa la probabilidad de un *base calling* erróneo. *Q scores* bajos pueden causar falsos positivos, por lo que conseguir un valor mínimo de Q30 es considerado esencial en las técnicas de secuenciación masiva (Tabla 10).

Tabla 10. Representación de la precisión obtenida en la secuenciación según el parámetro *QScore*.

<i>Q Score</i>	Probabilidad de base incorrecta	Precisión
10	1 en 10	90%
20	1 en 100	99%
30	1 en 1000	99,9%
40	1 en 10000	99,99%
50	1 en 100000	99,999

$Q = -10\log_{10}P$ ($P =$ probabilidad de error), *Qscore*: *Phred Quality Score*.

2.5.1 TECNOLOGÍA ION TORRENT Y ANÁLISIS DE LAS VARIANTES

La preparación de las librerías se realizó mediante el kit *Ion AmpliSeq™ Library Kit 2.0* (Ion Torrent), siguiendo las indicaciones del fabricante (Figura 5).

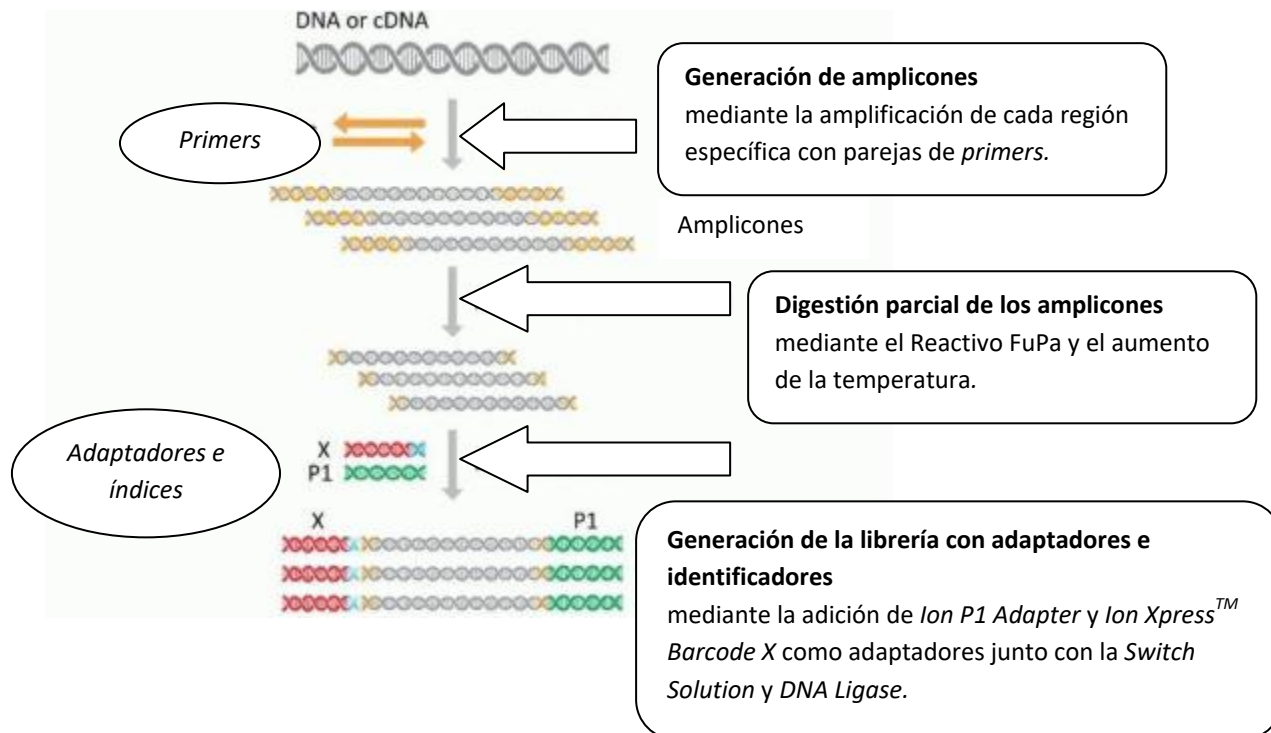


Figura 5. Esquema del protocolo seguido en la preparación de las librerías mediante el *Ion AmpliSeq™ Library Kit 2.0* (Ion Torrent). En la primera etapa se generan los amplicones a partir de ADN genómico y parejas de los *primers* de cada región a estudiar. Una vez generados los amplicones, se procede a una digestión parcial de los mismos con el reactivo FuPa, que permite la digestión de los primers y permite crear extremos 5'fosforilados para la unión de los adaptadores. Por último, se deben unir los adaptadores e identificadores, lo que permite que los amplicones se unan a las *beads* para la secuenciación e identificación de cada muestra.

Las librerías generadas se purificaron mediante *beads* magnéticas *Agencourt AMPure XP* (Beckman Coulter™, Brea, Estados Unidos) para eliminar todos los posibles contaminantes (dNTPs, sales, *primers*, dímeros...). Por último, las librerías se cuantificaron con métodos fluorimétricos (*Qubit™ 3.0 Fluorometer*, ThermoFisher Scientific) y se verificó su tamaño con *2100 Bioanalyzer™* (Agilent Technologies, Santa Clara, Estados Unidos).

La secuenciación se llevó a cabo con la plataforma *Ion P1 (Ion Personal Genome Machine System)* (PGM)) obteniendo los archivos *forward* y *reverse* de cada muestra en formato FASTQ. Los archivos generados se importaron automáticamente al sistema de análisis *Ion Reporter™ Server System* donde se realizó el alineamiento (mapeo de las

lecturas) con el programa *Torrent Mapping Alignment Program* (TMAP), el *Variant Calling* (comparación de las lecturas con el genoma de referencia) mediante el programa *Torrent Variant Caller* (TVC) y la anotación de las variantes con el programa *Ion Reporter* (Figura 6).

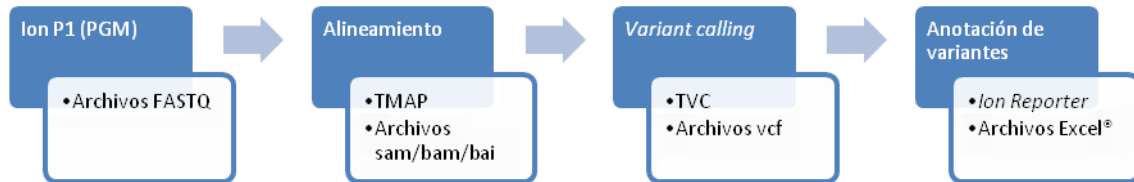


Figura 6. Esquema del protocolo seguido en el análisis bioinformático de las muestras secuenciadas en la plataforma *Ion P1*. El alineamiento se realizó con el *software* propio de *Ion Torrent*, *Ion Reporter Server System*. TMAP: *Torrent Mapping Alignment Program*; TVC: *Torrent Variant Caller*.

La anotación de variantes con el *software* *Ion Reporter* generó un archivo tipo Excel® de cada uno de los pacientes. Este archivo incluía parámetros como la cobertura, el valor-p, el tipo de variante y su localización, la frecuencia alélica, la predicción FATHMM o la clasificación dentro de bases de datos y algoritmos de predicción.

Se analizó el resultado de la carrera mediante el *Integrative Genomics Viewer* (IGV). Se filtraron aquellas variantes que se encontraron en zonas de cobertura heterogénea, con errores a su alrededor de menos de 500 lecturas y con una desproporción de la cadena *forward* y *reverse* (*strand bias*), en los extremos de las lecturas (*edge effect*) y en zonas homopolímeras y repetitivas que no eran las recurrentemente descritas. También se filtraron las variantes sinónimas y aquellas variantes descritas en >1% de la población (polimorfismos) tras la consulta de bases de datos poblacionales (*1000 Genomes Project*, dbSNP, ExAC).

Finalmente, se interpretaron los datos encontrados de cada variante anotada en las bases de datos COSMIC, IARC *TP53 Mutation Database*, ClinVar y OMIM, junto con los resultados de los algoritmos predictivos *SIFT*, *Polyphen2*, *MutationTaster* y *Mutation Assesor* en los casos de variantes no descritas.

2.5.2 TECNOLOGÍA ILLUMINA Y ANÁLISIS DE LAS VARIANTES

La preparación de librerías se realizó mediante el kit comercial *MYELOID SOLUTION*TM (SOPHIA GENETICS) según las recomendaciones del fabricante. La primera etapa consiste en una fragmentación enzimática, una reparación de los extremos y la unión de una cola poliA que permite la ligación de los adaptadores que identifican la muestra y permiten la unión a la superficie sólida donde tendrá lugar la secuenciación (*flow cell*). A continuación, se realizaron lavados y una selección de los fragmentos de ADN por medio de *beads* magnéticas (*AMPure XP beads*, Beckman CoulterTM) para la óptima amplificación de los productos generados. Por último, las librerías se cuantificaron con métodos fluorimétricos (*Qubit*TM 3.0 Fluorometer, ThermoFisher Scientific) y se verificó su tamaño con el kit z (Agilent Technologies) en un *2100 Bioanalyzer*TM (Agilent Technologies).

A continuación, se mezclaron todas las librerías y se procedió a la captura, mediante la hibridación con sondas y la amplificación de los productos generados a través de *beads* de estreptavidina (*Streptavidine beads*). Después de los lavados empleando las *AMPure XP beads*, se realizó la cuantificación final usando el kit *Qubit*TM *dsDNA HS Assay* (Invitrogen, Carlsbad, Estados Unidos) y el *Qubit 3 Fluorimeter*. El tamaño de los fragmentos se verificó mediante el kit de *Agilent HS DNA* (Agilent Technologies) en el *2100 Bioanalyzer*TM (Figura 7).

Se procedió a la secuenciación de las muestras en un secuenciador *Miseq* (Illumina) a una concentración de 8,5pM.

Finalmente, los archivos *forward* y *reverse* de cada muestra en formato FASTQ se cargaron en la plataforma SOPHIA DDM® (SOPHIA GENETICS) para su análisis informático. Este *software* realiza el alineamiento, *variant calling* y anotación de variables con *pipelines* propios. Además, ofrece un listado de variantes caracterizadas en las que se detalla la cantidad de veces reportadas en la carrera, en el usuario y en todos los usuarios de la comunidad, así como su clasificación, los resultados de los algoritmos de predicción y enlaces directos al IGV y a las bases de datos COSMIC, ClinVar y dbSNP.



Figura 7. Esquema de las etapas para la preparación de las librerías generado con el kit *MYELOID SOLUTION* de SOPHIA GENETICS.

2.5.3 ANÁLISIS DE LA EVOLUCIÓN CLONAL

En los SMD se han descrito diferentes patrones de evolución clonal: la evolución clonal lineal, que consiste en la adquisición sucesiva de variantes patogénicas a partir de un clon ancestral dominante, y la ramificada, que se basa en diferentes subclones que emergen del clon ancestro, pero que coexisten y comparten algunas de estas variantes patogénicas⁷¹.

El paquete *Fishplot R v.3.2.2 (The R Foundation)*⁸² se usó para reconstruir y visualizar la arquitectura clonal y la evolución durante el transcurso de la enfermedad. Por ello se analizaron las frecuencias alélicas de las variantes detectadas en cada tiempo y la estimación de sus relaciones subclonales. Esta información se integró junto con los datos del cariotipo del paciente.

2.6 ANÁLISIS DEL FENOTIPO

El análisis por citometría de flujo se realizó en las muestras de MO en fresco mediante la estrategia de *gating* sugerida por Bento y cols.⁸³ para el estudio de los pacientes con SMD. Se emplearon los anticuerpos monoclonales CD16-FITC (Becton Dickinson, Franklin Lakes, Estados Unidos), CD13-PE (Becton Dickinson), CD34-PER-CP (Becton Dickinson), CD117-PE-CY7 (Beckman Coulter), CD11b-APC (Becton Dickinson), CD71-APC-H7 (Becton Dickinson), CD64-V-450 (Becton Dickinson) y CD45-V-500 (Becton Dickinson). El análisis se realizó en un citómetro de flujo FASCcant II 8 colores (Becton Dickinson). Para el estudio de las células mesenquimales se usó el anticuerpo monoclonal CD31-FITC (Becton Dickinson). Los resultados se analizaron y visualizaron con el software de análisis InfinicytTM (Cytognos, Salamanca, España) y el software de análisis FACSDiva (Becton Dickinson).

2.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se analizó la distribución de las variables mediante el *Test de Kolmogorov-Smirnov* y el *Test de Shapiro-Wilk*. La comparación de medias de muestras independientes se realizó con el test no paramétrico de *U-Mann Whitney* o con el *Test T-Student* cuando los datos seguían una distribución normal.

Para la comparación de variables cualitativas, se aplicó el *Test χ^2 de Pearson*, o el *Test de Fisher* cuando alguna de las variables fue inferior a 5.

La asociación entre las variables genómicas y las variables clínico-biológicas con la supervivencia global (SG) y la supervivencia libre de transformación (SLT) se determinó mediante el método de *Kaplan-Meier* para estimar la distribución de las mismas, y las diferencias entre los dos grupos se analizaron con el *Test de Log-Rank*. La SG se definió como el tiempo transcurrido desde la fecha del diagnóstico del SMD a la fecha de *exitus* o último seguimiento. La SLT se definió como el tiempo transcurrido desde la fecha del diagnóstico de SMD hasta la fecha en la que se documentó la transformación leucémica. El análisis multivariado se realizó mediante la Regresión de Cox.

En el análisis estadístico se empleó el programa estadístico *IBM SPSS Statistics 19*.

RESULTADOS

**1. RESULTADOS I - Caracterización genética de los SMD:
Asociación del perfil mutacional con las características
clínicas y supervivencia.**

1.1 DESCRIPCIÓN DE PACIENTES Y MUESTRAS

Se realizó un estudio observacional y retrospectivo en el que se incluyeron un total de 106 pacientes diagnosticados de SMD, entre los años 2014 y 2018, procedentes de los Hospitales Universitarios Fundación Jiménez Díaz (Madrid), Rey Juan Carlos (Móstoles), Infanta Elena (Valdemoro) y General de Villalba (Villalba).

Todos los pacientes se diagnosticaron siguiendo los criterios de la actual clasificación de la OMS¹, con representación de todos los subtipos. Destacó la presencia de un mayor número de SMD de bajo riesgo (SMD-DUL, SMD-DML, SMD-SA-DUL, SMD-SA-DML, del(5q) y SMD-I) con respecto a los subtipos de alto riesgo (SMD-EB-I y SMD-EB-II) (67,9% vs 32,1%). Los hallazgos analíticos más representativos fueron la anemia (n=55; 51,9%), la neutropenia (n=53; 50%) y la trombocitopenia (n=49; 46,2%). Un 67% de los pacientes presentaron un porcentaje de blastos <5%. Es importante destacar que no se pudo calcular el IPSS-R en 29 pacientes (27,3%), debido a que el cariotipo no fue informativo. El 71,7% de los pacientes no recibieron tratamiento (n=39) o recibieron tratamiento de soporte con EPO (n=37), mientras que solo el 25% de ellos recibieron azacitidina (n=27). De los tres pacientes restantes, dos recibieron LENA y uno hidroxiurea.

Se analizaron muestras de ADN procedentes de MO obtenida en 84 pacientes al diagnóstico, en 20 pacientes con enfermedad estable, y en 2 pacientes al diagnóstico de una progresión a un SMD-EB (n=2). Los datos clínicos se encuentran resumidos en la Tabla 11.

Tabla 11. Características clínicas y biológicas de los 106 pacientes diagnosticados de SMD.

Características clínicas	N (%)
Edad	
Mediana (rango)	75,5 años (39-94)
<75 años	52 (49,1)
Sexo	
Hombres	72 (67,9)
Mujeres	34 (32,1)
Subtipos de SMD	
SMD-DUL	6 (5,7)
SMD-DML	29 (27,4)
SMD-SA-DUL	10 (9,4)
SMD-SA-DML	17 (16)
SMD del5q	9 (8,5)
SMD-EB-I	23 (21,7)
SMD-EB-II	11 (10,4)
SMD-i	1 (0,9)
Citopenias	
Anemia (Hemoglobina < 10g/dL)	55 (51,9)
Neutropenia (Neutrófilos <1,8·10 ⁹ /L)	53 (50)
Trombopenia (Plaquetas <100·10 ⁹ /L)	49 (46,2)
Blastos en MO	
<1%	21 (19,8)
1-<5%	50 (47,2)
5-<10%	24 (22,6)
10-<20%	11 (10,4)
Cariotipo	
Informativo	77 (72,6)
Alterado	45 (58,4)
IPSS-R	
Muy bajo	13 (12,3)
Bajo	30 (28,3)
Intermedio	14 (13,2)
Alto	7 (6,6)
Muy alto	13 (12,3)
No valorable	29 (27,3)
Tratamiento inicial	
Sin tratamiento	39 (36,8)
Eritropoyetina	37 (34,9)
Azacitidina	27 (25,5)
Lenalidomida	2 (1,9)
Hidroxiurea	1 (0,9)
Nº de Tratamientos	
0	37 (34,9)
1	45 (42,4)
2	20 (18,9)
>2	4 (3,8)

1.2 ESTUDIOS CITOGENÉTICOS: CARIOTIPO Y FISH

Se realizó el estudio del cariotipo de los 106 pacientes diagnosticados de SMD, siendo informativo en un 72,6% (n=77) de los casos, de los que un 58,4% (n=45) presentaban alguna alteración citogenética.

Con respecto a los pacientes que presentaron un cariotipo alterado, 26 (57,8%) mostraron una única alteración. Los cromosomas 5 (n=8), 20 (n=5), 11 (n=5), 7 (n=2), 8 (n=2) e Y (n=2) fueron los más frecuentemente afectados. En ocho pacientes (17,8%), se observaron dos alteraciones involucrando principalmente a los cromosomas 8 (n=6) y 20 (n=4). Por último, se detectaron 3 o más alteraciones (cariotipo complejo), en 2 y 9 casos, respectivamente. Estos 9 pacientes presentaron anomalías en los cromosomas 5 y 7 (Figura 8).

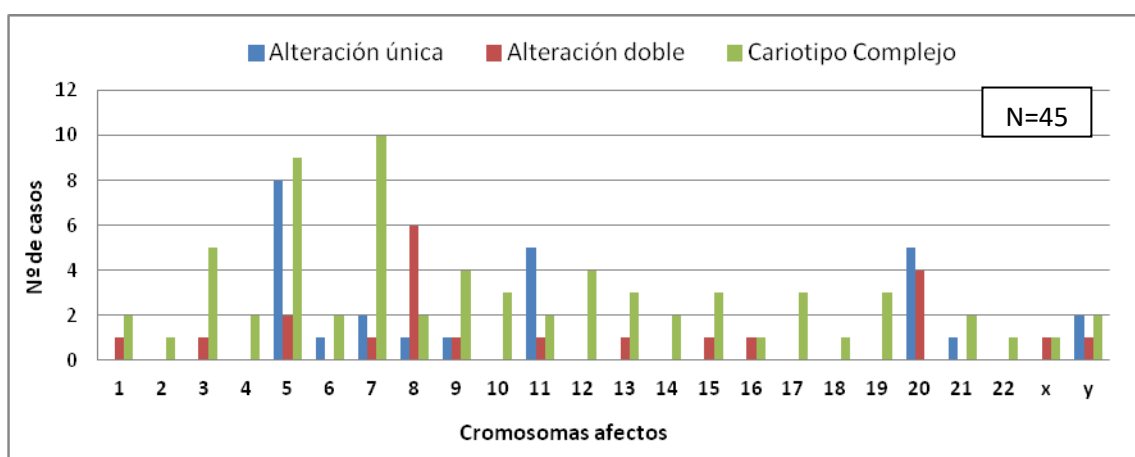


Figura 8. Distribución de los cromosomas afectados en 45 pacientes con cariotipo alterado.

La técnica de FISH se realizó en 42 pacientes: 20 pacientes en los que no se obtuvieron metafases y 22 pacientes para la confirmación de alteraciones presentes en el mismo.

El cromosoma 5 se estudió en 35 pacientes: **(i)** en 17 pacientes que presentaron un cariotipo no informativo, detectándose en tres la del(5q), **(ii)** en 14 casos con cariotipo alterado, en los que en 11 se confirmó la del(5q) y en uno la monosomía 5, y **(iii)** en 4 pacientes con cariotipo normal, en los que se detectó la del(5q) en un único caso. A su vez, el cromosoma 7 se analizó en 30 pacientes: **(i)** en 16 pacientes con cariotipo no informativo, detectándose la del(7q) en un caso y la monosomía 7 en dos, **(ii)** en 11 casos con cariotipo alterado, donde se confirmó la del(7q) y la monosomía 7, en cinco

y tres pacientes, respectivamente, y **(iii)** en tres casos con cariotipo normal, donde se detectó la del(7q) en un único caso (Figura 9).

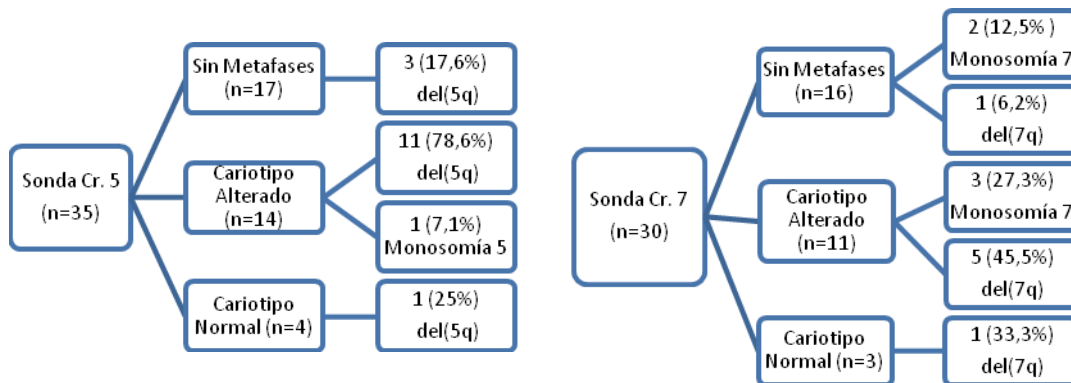


Figura 9. Esquema de los casos en los que se ha utilizado la técnica de FISH para la detección de alteraciones de los cromosomas 5 y 7. Cr: cromosoma.

Se estudiaron tres casos con la sonda centromérica del cromosoma 8: **(i)** dos de ellos presentaban un cariotipo alterado y sólo uno fue positivo para la trisomía 8, y **(ii)** un caso con cariotipo no informativo con resultado negativo. El cromosoma 20 y el gen *TP53* también fueron estudiados con resultados positivos (del(20q) y del(*TP53*)), en los dos casos con cariotipo alterado que se analizaron.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos de ambas técnicas, se observaron alteraciones genéticas en un 42,5% de los casos considerando únicamente el resultado del cariotipo, mientras que aumentó al 49,1% cuando se añadió la información resultante de la técnica de FISH (Figura 10).

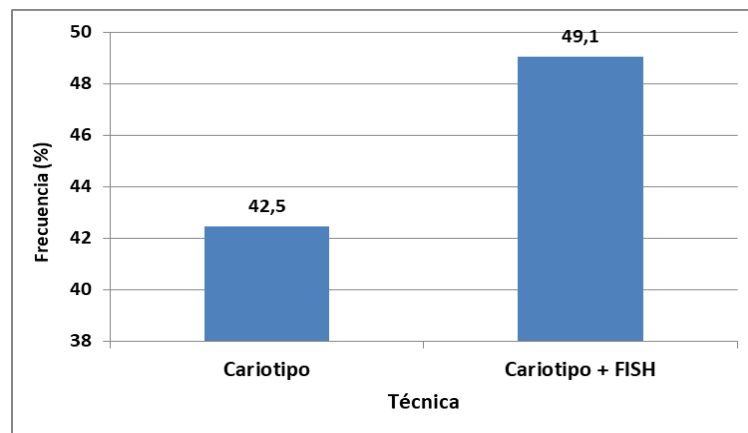


Figura 10. Información genética obtenida mediante el cariotipo y la combinación del cariotipo y FISH.

1.3 SECUENCIACIÓN SANGER

Gen TP53

Se realizó la secuenciación *Sanger* de los exones 4, 5, 6, 7, 8 y 9 del gen *TP53* en 7 de los 9 pacientes con SMD-del(5q). No se detectaron variantes patogénicas en ninguno de los pacientes analizados.

Gen ASXL1

La secuenciación *Sanger* de los exones 11 y 12 del gen *ASXL1* se realizó en 68 pacientes, en 61 se obtuvieron secuencias analizables y en siete no fueron valorables. De las 61 muestras que se pudieron analizar, 51 (83,6%) presentaron la secuencia nativa, mientras que 10 (16,4%) presentaron variantes patogénicas. Los detalles de las variantes detectadas se resumen en la Tabla 12.

Tabla 12. Características de los pacientes y variantes detectadas mediante secuenciación tipo *Sanger* del gen *ASXL1*.

Nº	Diagnóstico	Cariotipo	IPSS-R	Variante CDS	Variante AA	T. LMA	Exitus
26	SMD-SA-DML	Sin Metafases	ND	c.1934dup	p.G646Wfs*12	No	No
49	SMD-DML	46,XY[20]	Bueno	c.1900_1922del	p.E635Rfs*15	No	Si
59	SMD-DML	45,XX,-7[17]	Intermedio	c.1934dup	p.G646Wfs*12	No	No
68	SMD-DML	46,XY[10]	ND	c.2253insA	p.A752Sfs*22	No	Si
71	SMD-DML	Sin Metafases	ND	c.1774C>T	p.Q592*	Si	Si
75	SMD-EB-I	46,XY[18]	ND	c.1934dup	p.G646Wfs*12	Si	Si
78	SMD-EB-I	47,XX,t(X;20)(q13;q13),+8[12]	Malo	c.1934dup	p.G646Wfs*12	Si	Si
91	SMD-EB-I	Sin Metafases	ND	c.1934dup	p.G646Wfs*12	Si	Si
93	SMD-EB-I	46,XY,del(20)(q11.2)[7]	Intermedio	c.1934dup	p.G646Wfs*12	No	Si
95	SMD-EB-II	46,XY[5]	ND	c.1900_1922del	p.E635Rfs*15	Si	Si

ND: No disponible, T.LMA: Transformación a LMA.

1.4 SECUENCIACIÓN MASIVA

Se analizaron los datos obtenidos con dos paneles de secuenciación masiva: el panel customizado de *Ion Torrent* (n=68 pacientes) y el panel comercial de SOPHIA GENETICS (n=38 pacientes), con una cobertura mayor a 500x en todos los casos. Solo se tuvieron en cuenta para el análisis estadístico aquellas variantes clasificadas como patogénicas, probablemente patogénicas y de significado incierto con una frecuencia alélica $\geq 2\%$.

1.4.1 Comparación de las plataformas empleadas

A pesar de los diferentes genes incluidos en cada panel, los resultados entre ambos secuenciadores fueron comparables. La diferencia entre las medias de las variantes patogénicas detectadas en ambas plataformas no fue estadísticamente significativa ($\text{media}_{\text{ThermoFisher}} = 2,10$ vs $\text{media}_{\text{Illumina}} = 2,45$; $p=0,152$). Sin embargo, se detectaron variantes en los genes *STAG2* (n=6), en *BCOR* (n=5), en *PHF6* (n=3) y *GNAS*, *NF1* y *RAD21* (n=1, en cada caso), incluidos únicamente en el panel customizado de Ion Torrent.

1.4.2 Información genética obtenida en los 106 pacientes de SMD

Del total de 106 pacientes estudiados, se detectó al menos una variante en el 86,8% de los casos (n=92), con una mediana de 2 variantes por paciente (rango, 0-7). En el 30,4% (n=28) se detectó un cariotipo normal y en un 27,2% (n=25) un cariotipo no informativo.

Los resultados del análisis del perfil mutacional de los pacientes mediante técnicas de secuenciación masiva, junto con los resultados obtenidos con el cariotipo y la FISH, permitió obtener información genética en un 92,5% de los pacientes (Figura 11).

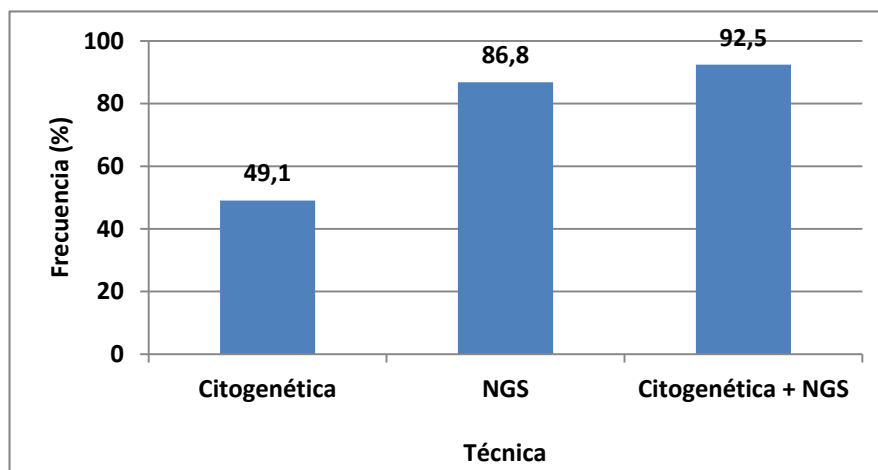


Figura 11. Información genética obtenida mediante técnicas citogenéticas, secuenciación masiva y la combinación de ambas. NGS: *Next generation sequencing*.

1.4.3 Genes y vías celulares más frecuentemente alteradas

Se detectaron un total de 236 variantes génicas: **(i)** 141 fueron variantes *missense* (cambio de nucleótido), **(ii)** 63 *frameshift* (cambio de patrón de lectura), de inserción (n=34) y deleción (n=29), y **(iii)** 32 *non-sense* (codón de parada).

Los genes más frecuentemente afectados, en más del 15% de los casos, fueron *SF3B1* (29,2%), *TET2* (26,4%), *ASXL1* (20,7%), *DNMT3A* (18,9%), *SRSF2* (17,9%) y *RUNX1* (16%). En el 10-15% de los casos se encontraron alterados los genes *TP53* y *U2AF1* (11,3% y 10,4%, respectivamente). En el 5-10% presentaron el gen *STAG2* alterado (5,7%) y en el 2-5% de los casos se detectaron variantes en los genes *SETBP1* (4,7%), *BCOR* (4,7%), *IDH2* (4,7%), *CBL* (2,8%), *JAK2* (2,8%), *KRAS* (2,8%), *NRAS* (2,8%), *PHF6* (2,8%) y *PTPN11* (2,8%). Otros genes recurrentemente afectados fueron *ETV6*, *IDH1*, *NPM1* y *ZRSF2*, en un 1,9% cada uno, y *EZH2*, *FLT3*, *GNAS*, *NF1* y *RAD21*, en un 0,9%. No se detectaron variantes patogénicas en los genes *ABL1*, *BRAF*, *CALR*, *CDKN2A*, *CEBPA*, *CSF3R*, *HRAS*, *KIT*, *LUC7L2*, *MPL*, *RPS14*, *SF1*, *SF3A1*, *SMC13*, *SPARC* y *WT1* (Figura 12).

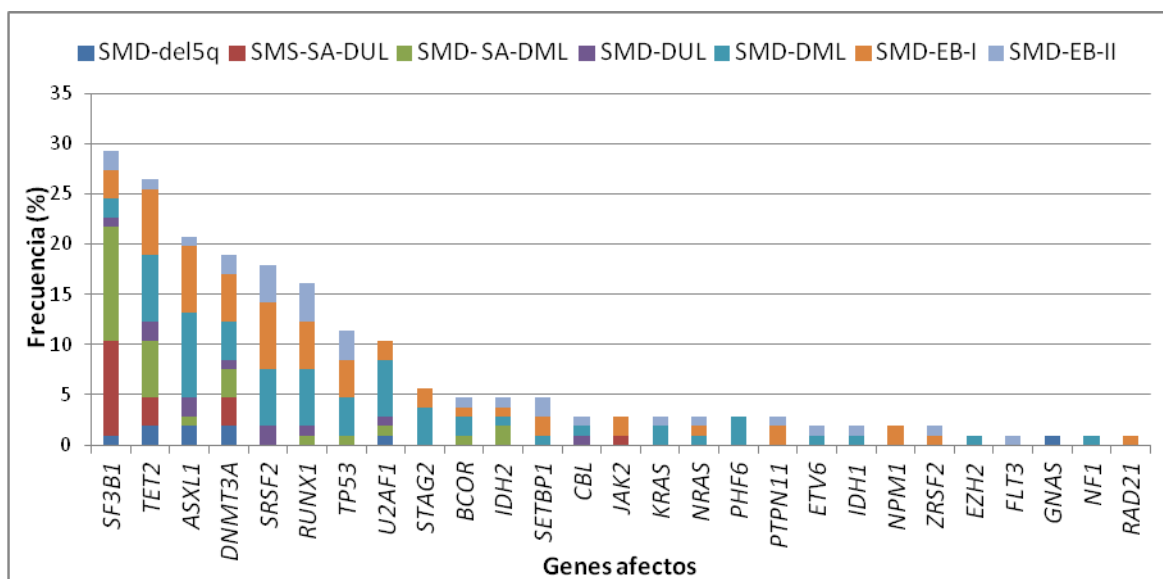


Figura 12. Frecuencia de los 27 genes afectados en 106 pacientes diagnosticados de SMD.

Con respecto a las vías celulares, los genes incluidos en los paneles usados se clasificaron en las diferentes categorías según las vías funcionales en las que intervienen (Figura 13)



Figura 13. Clasificación de los genes según su implicación en las vías biológicas.

Las vías más frecuentemente afectadas fueron, en orden decreciente, las relacionadas con los mecanismos de *splicing* del ARN (n=62; 58,5%), la vía de metilación del ADN (n=46; 43,4%), los factores de la transcripción (n=25; 23,6%), los genes modificadores de la cromatina (n=22; 20,7%), los genes de la vía RAS (n=12; 11,3%), la vía de reparación del ADN (n=12; 11,3%), los genes implicados con las cohesinas (n=7; 6,6%), los genes receptores quinasas (n=4; 3,8%) y otras categorías (n=2; 2,83%) (Figura 14).

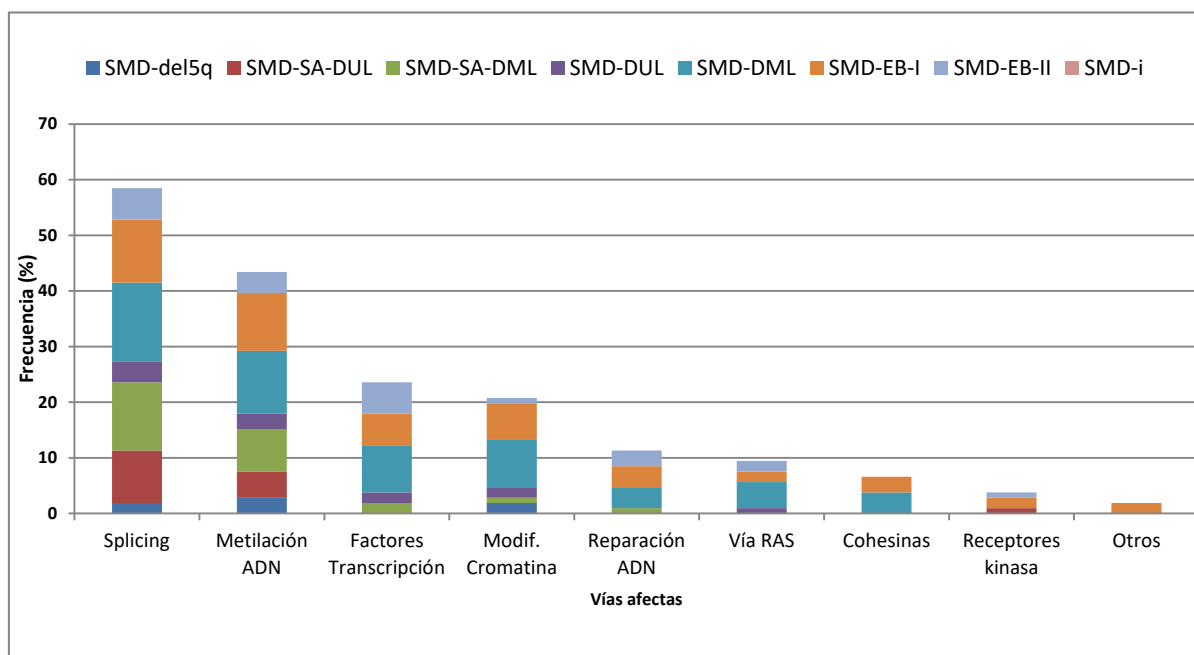


Figura 14. Frecuencia de las vías celulares alteradas en 106 pacientes con SMD.

Coexistencia y exclusividad de variantes génicas y vías afectas

El análisis de coexistencia y exclusividad de variantes génicas y vías afectas sugirió la presencia de mecanismos cooperativos y de la redundancia funcional entre estas variantes.

Se detectó exclusividad entre los genes de la vía del *splicing*: *SF3B1* y *SRSF2* ($p=0,020$), *SF3B1* y *U2AF1* ($p=0,031$) y *SRSF2* y *U2AF1* ($p=0,205$). Aunque la diferencia no fue significativa, ninguno de los pacientes estudiados presentó ambas variantes simultáneamente (Figura 15).

Se observó la coexistencia entre el principal gen de la vía de metilación de ADN, *TET2*, con *SRSF2* ($p=0,013$) y exclusividad con *U2AF1* ($p=0,035$). También, se detectó la exclusividad de *DNMT3A* con *SRSF2* ($p=0,021$).

Dentro de los genes con función transcripcional destacó la coexistencia de *RUNX1* con *SRSF2* ($p=0,004$) y una tendencia a la coexistencia con *ASXL1* ($p=0,108$). A su vez, el gen *ASXL1* presentó coexistencia con *SRSF2* ($p=0,007$) y una tendencia a la exclusividad con *DNMT3A* ($p=0,064$).

En relación con la vía de reparación del ADN, en el gen *TP53* se detectó la exclusividad con *SF3B1* ($p=0,017$) y con *TET2* ($p=0,033$).

Además, se detectaron también otras asociaciones destacables, aunque no pudieron definirse como significativas estadísticamente debido a la baja frecuencia de pacientes con estos genes afectados. En el caso de *IDH2*, no se encontraron variantes de este gen en coexistencia con variantes de *DNMT3A*, *TP53*, *U2AF1* y *TET2*. Sin embargo, si se detectó la coexistencia significativa entre *IDH2* y *SRSF2* ($p=0,034$) y una tendencia entre *IDH2* y *ASXL1* ($p=0,071$).

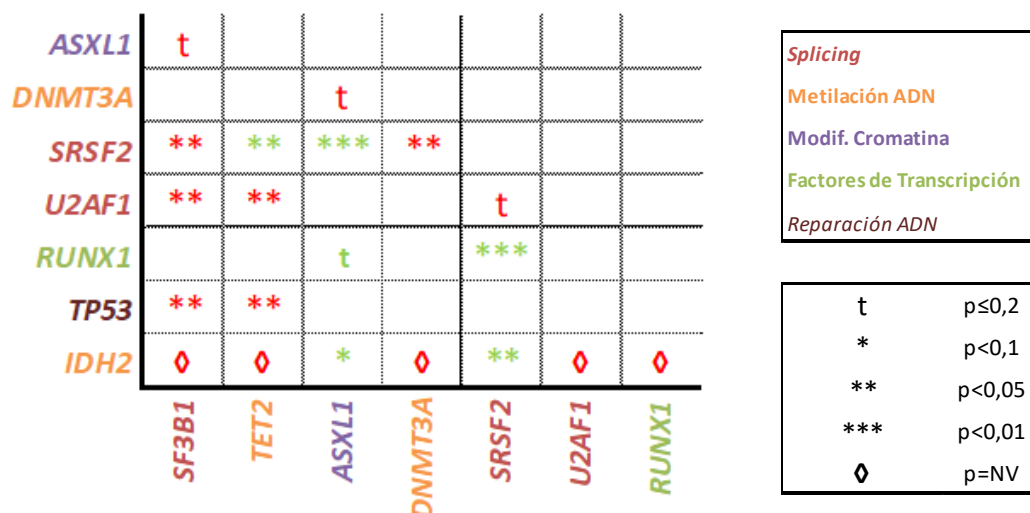


Figura 15. Representación de la asociación entre los genes más frecuentemente alterados. Símbolos de la leyenda en color rojo (exclusividad) y color verde (coexistencia).

1.4.4 Perfil molecular según el subtipo de SMD

Al analizar el tipo de variantes según los subtipos de SMD, se observó cómo las variantes *missense* fueron las mayoritarias en todos los subtipos, siendo las más frecuentemente detectadas en los SMD-SA-DUL (n=16/18; 88,9%;) y las menos frecuentes en los SMD-del5q (n=4/9; 44,4%). Las variantes *non-sense* fueron más frecuentes en los SMD-DUL (n=6/17; 35,3%) y en los SMD-del5q (n=4/9; 44,4%), y las *frameshift* se observaron en todos los subtipos (9-24%), a excepción de los SMD-del(5q) (Figura 16).

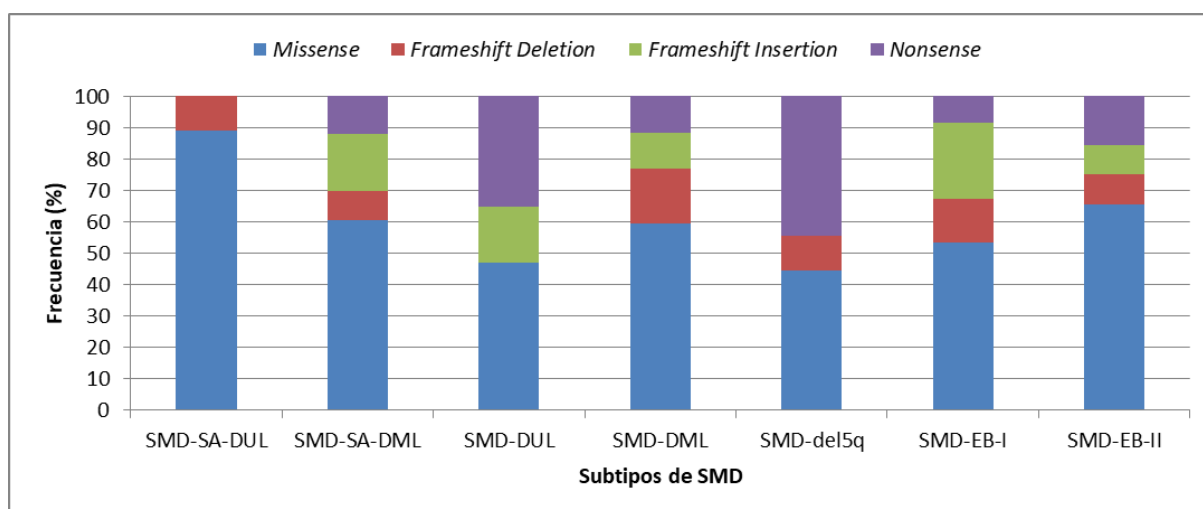


Figura 16. Frecuencia de los tipos de variantes patogénicas según el subtipo de SMD.

El 60,9% de las variantes *missense* y *non-sense* detectadas corresponden a transiciones, cambios de tipo purina a purina (AG) o pirimidina a pirimidina (CT), y un 39,1% a transversiones, cambios de purina a pirimidina o pirimidina a purina (Figura 17).

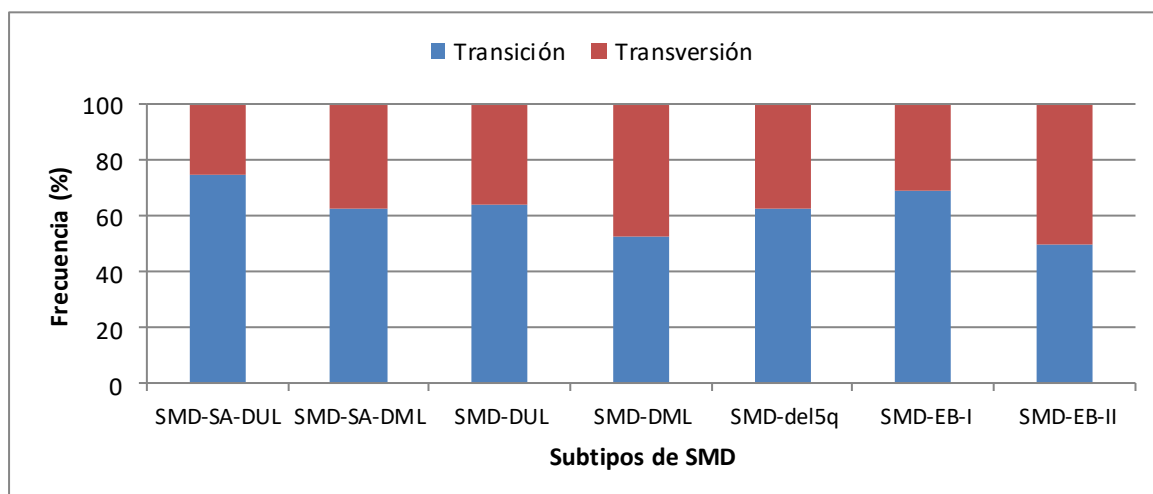


Figura 17. Frecuencia de las variantes de transición y transversión según el subtipo de SMD.

El número de variantes y el espectro mutacional se asoció con los subtipos de la OMS. Con respecto al número medio de variantes se observó cómo los subtipos de SMD-del(5q) y SMD-SA-DUL presentaron como máximo dos y tres variantes, respectivamente, mientras que la presencia de cuatro o más variantes fue más frecuente en los subtipos de alto riesgo. Llama la atención que más del 30% de los SMD-DUL presentaron más de cuatro variantes patogénicas (Figura 18).

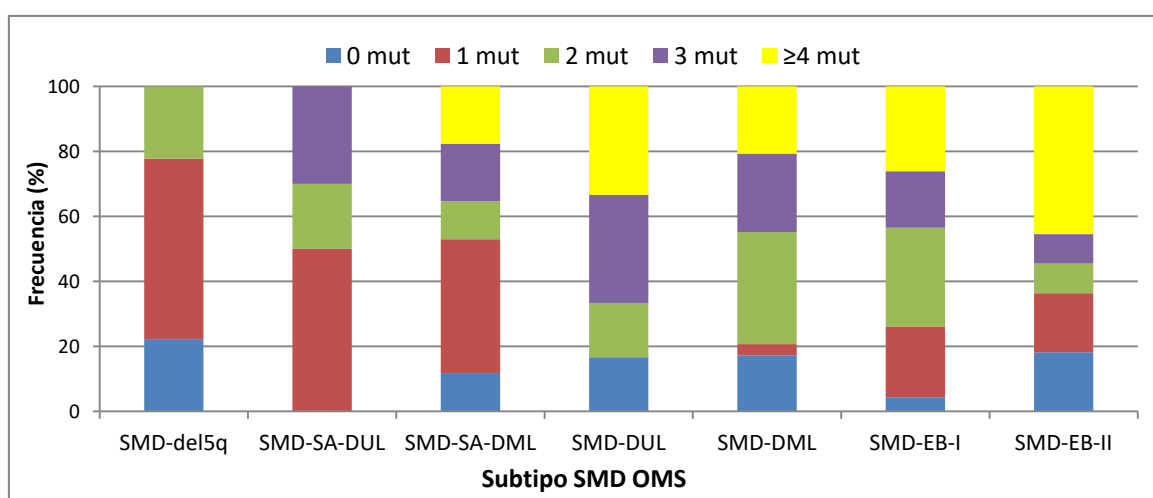


Figura 18. Número de variantes patogénicas según el subtipo de la OMS. Mut: mutaciones.

De la misma manera, el número medio de variantes de los subtipos de bajo riesgo fue menor que los subtipos de alto riesgo, con la excepción de los SMD-DUL que presentaron una media de 2,8 variantes por caso (Figura 19).

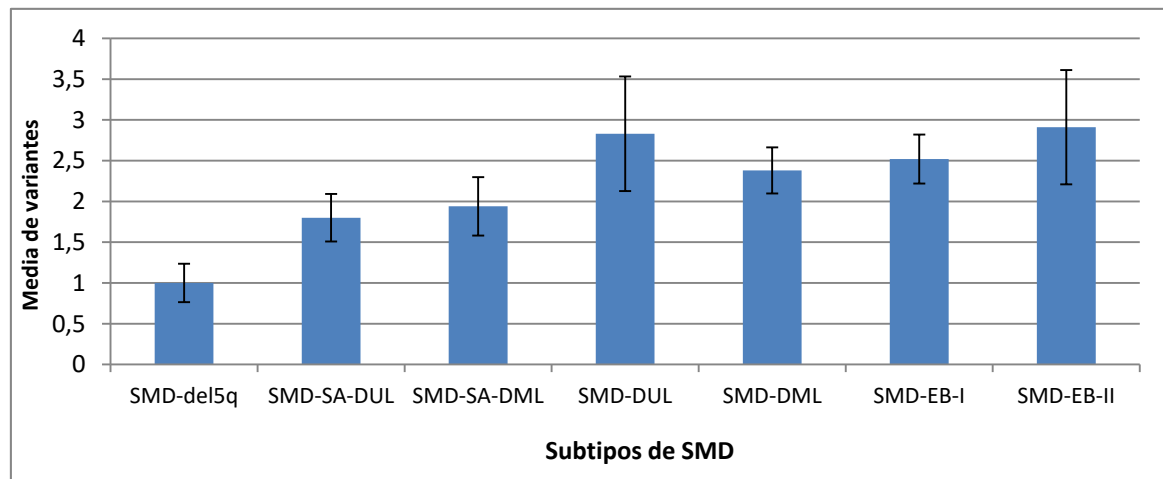


Figura 19. Número medio de variantes según el subtipo de la OMS. Los SMD de bajo riesgo SMD-del(5q), SMD-SA-DUL, SMD-SA-DML y SMD-DML presentaron un número medio de variantes patogénicas por paciente de 1, 1,8, 1,9 y 2,38, respectivamente, mientras que los subtipos de alto riesgo SMD-EB-I y EB-II presentaron un número medio de 2,5 y 2,9, respectivamente. Sorprendentemente, los SMD-DUL presentaron un número medio de mutaciones de 2,8.

Con respecto al espectro mutacional según el subtipo de la OMS, se confirmó la afectación de la vía del *splicing* en los SMD-SA (*SF3B1* y *U2AF1*). Los subtipos con displasia multilínea y con exceso de blastos, presentaron una mayor heterogeneidad en su perfil molecular. Al aumentar la enfermedad en complejidad y progresar a subtipos de mayor riesgo, se detectaron más frecuentemente variantes en genes relacionados con factores de la transcripción, modificadores de la cromatina y otras vías como RAS y la reparación de ADN. El perfil de cada uno de los pacientes se encuentra detallado en la Figura 20.

No se detectaron variantes patogénicas en 14 pacientes: SMD-DML (n=5; 35,7%), SMD-del5q (n=2; 14,3%), SMD-SA-DML (n=2; 14,3%), SMD-EB-II (n=2; 14,3%), SMD-DUL (n=1; 7,1%), SMD-EB-I (n=1; 7,1%) y SMD-i (n=1; 7,1%).

Splicing Metilación del ADN Factores Transcripción Modif. Cromatina Receptores kinasa Cohesinas Vía RAS Reparación ADN Otros

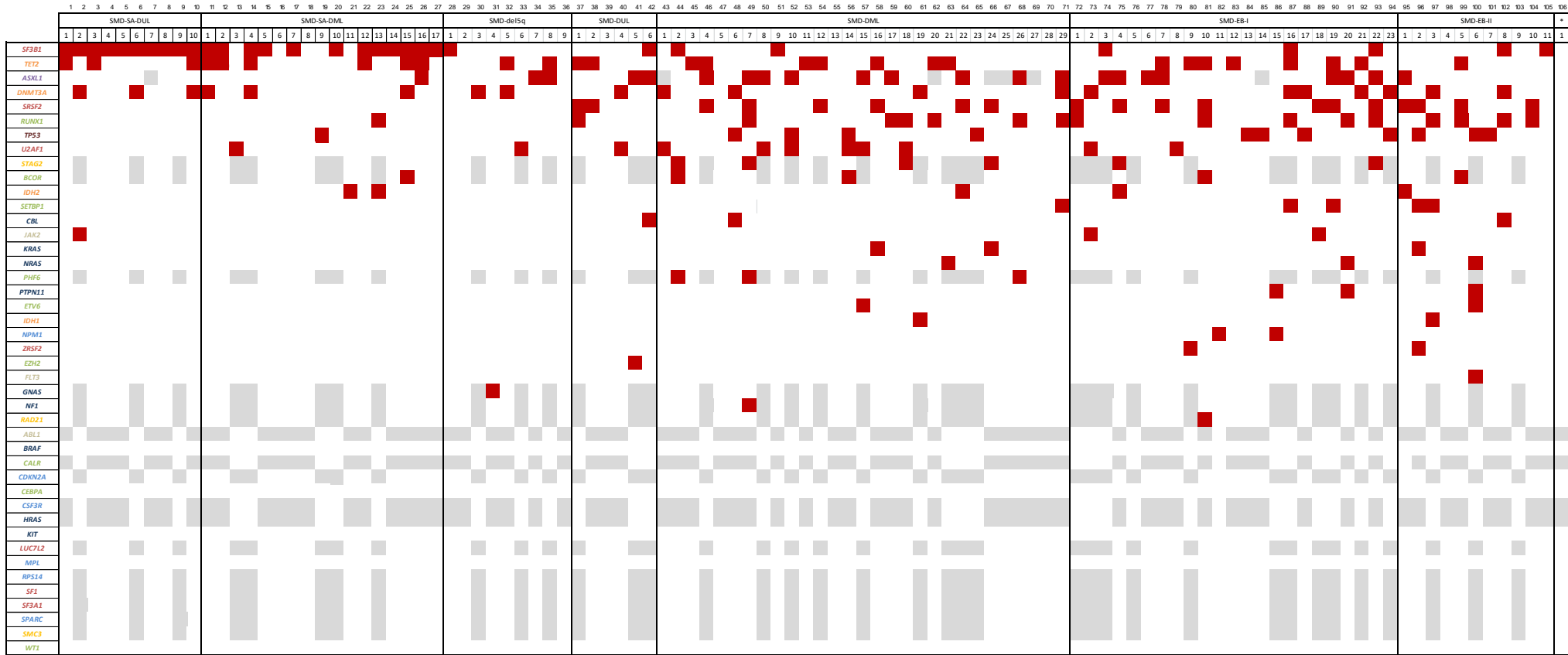


Figura 20. Perfil mutacional de los 106 pacientes con SMD clasificados según su subtipo de la OMS. Se representa en color rojo (■) las variantes patológicas detectadas, en blanco los genes que no presentaron variantes y en color gris (■) los genes no estudiados por no estar presentes en la plataforma de NGS. *: SMDi.

1.4.5 Genes más frecuentemente alterados: descripción de las variantes y asociación con características clínicas de los pacientes

- Factores de *splicing* (*SF3B1*, *SRSF2*, *U2AF1*)

El gen más recurrentemente alterado en SMD y el principal gen afecto de la vía que implica el *splicing* del ARN fue el gen *SF3B1*, detectado en 31 pacientes, en uno de ellos con una mutación doble (paciente 20). Las variantes más frecuentes fueron las que implicaron a los codones K700 (n=16; 48,5%), R625 (n=6; 18,2%), K666 (n=3; 9,1%), E622 (n=3; 9,1%) y K662 (n=2; 6,1%). Todas las variantes fueron de tipo *missense*, excepto una variante de tipo *frameshift* en el codón Y474. Todas las variantes detectadas se clasificaron como oncogénicas. En el presente trabajo, las variantes en *SF3B1* se asociaron con un subtipo de SMD de bajo riesgo (p=0,024) y a un IPSS-R de bajo riesgo (puntuación $\leq 3,5$) (p=0,033). La afectación de este gen fue más frecuente en pacientes con cariotipo normal aunque esta asociación no alcanzó la significación estadística (p=0,089).

Con respecto al gen *SRSF2*, en 19 pacientes se detectaron variantes patogénicas en el *hotspot* P95, 18 de ellos presentaron la variante patogénica *missense* P95H/L y una variante de tipo *frameshift inframe* en esta misma región clasificada como variante de significado incierto. Las variantes en este gen se asociaron con subtipos de SMD de alto riesgo (p=0,019) y con trombocitopenia (p=0,001).

El gen *U2AF1* se encontró alterado en 11 pacientes de la cohorte: 4 presentaron las variantes patogénicas Q157P y 7 pacientes la S34F/Y. No se encontraron asociaciones con ninguna variable clínica.

- Metilación del ADN (*TET2*, *DNMT3A*, *IDH2*)

TET2 fue el segundo gen más alterado, se detectaron 40 variantes en 28 pacientes. Siete pacientes presentaron dos mutaciones (pacientes 11, 12, 14, 45, 53, 58, 25), uno presentó tres variantes (paciente 38) y otro paciente cuatro (paciente 99). Las variantes se encontraron a lo largo del gen siendo de tipo *missense* (n=12; 30%), *non-sense* (n=10; 25%) y *frameshift* (n=18; 45%). Un 87,5% (n=35) se clasificaron como variantes oncogénicas, un 10% (n=4) de posiblemente oncogénicas y un 2,2% de

significado incierto (n=1). La presencia de variantes en *TET2* se asoció con pacientes de IPSS-R de bajo riesgo (p=0,002) y se observó una tendencia en aquellos pacientes que presentaron cariotipo normal (p=0,054).

Se detectaron 21 variantes de *DNMT3A* en 20 pacientes, en los que uno de ellos presentó una doble alteración (paciente 6). La mayoría de las variantes fueron de tipo *missense* (n=12; 57,1%), *non-sense* (n=4; 19,1%) y *frameshift* (n=5; 23,8%). Dieciséis de las 21 variantes (76,2%) se clasificaron como oncogénicas y 5 de ellas (23,8%) se clasificaron como posiblemente oncogénicas. Las variantes en *DNMT3A* se asociaron a pacientes ≥ 75 años (p=0,017) y sin trombocitopenia (p=0,035).

IDH2 se encontró alterado en cinco pacientes detectándose la variante oncogénica R140Q en todos los pacientes. No se encontraron asociaciones con ninguna variable clínica.

- **Modificadores de la cromatina (*ASXL1*)**

Se detectaron 25 variantes del gen *ASXL1* en 22 pacientes, detectándose un paciente con una variante doble (paciente 41) y otro con una triple (paciente 52). La mayoría de las variantes fueron de tipo *frameshift* (n=19; 76%) mientras que un 24% fueron de tipo *non-sense*, todas ellas oncogénicas. La variante más frecuente fue la G646Wfs*12, en el 42,1% de los casos (n=8). No se encontraron asociaciones con las variables clínicas de los pacientes.

- **Factores de la transcripción (*RUNX1*)**

El factor de la transcripción más frecuentemente alterado fue el gen *RUNX1*, con un total 20 variantes detectadas en 17 pacientes. Un paciente presentó una variante triple (paciente 37) y otro paciente presentó una variante doble (paciente 68). Las variantes fueron de tipo *missense* (n=12), de tipo *frameshift* (n=6) y de tipo *non-sense* (n=2). Las variantes analizadas se clasificaron como oncogénicas (n=14) o posiblemente oncogénicas (n=6). La presencia de esta variante se asoció con los subtipos de alto riesgo (p=0,044) y mostró una tendencia con la trombocitopenia (p=0,095) y con blastos $>10\%$ (p=0,074).

- Reparación del ADN (*TP53*)

Se detectaron 15 variantes a lo largo del gen *TP53* en 12 pacientes. Las variantes detectadas fueron principalmente de tipo *missense* (n=9; 60%) y de tipo *non-sense* (n=4; 26,7%), mientras que solo dos variantes fueron de tipo *frameshift* (n=2; 13,3%). Trece de las variantes detectadas (86,7%) fueron clasificadas como oncogénicas y, únicamente dos (13,3%), de posiblemente oncogénicas. Además de la presencia de una variante patogénica, es importante el número de eventos (*hits*) que sufre este gen, que puede deberse a variantes patogénicas o bien a deleciones del mismo. En nuestra serie, se detectaron siete pacientes con diferentes eventos (*multi-hits*), tres de ellos presentaron dos variantes patogénicas (pacientes 84, 88 y 94) y cuatro tenían una variante patogénica junto a la delección del otro alelo (pacientes 56, 85, 96 y 101).

La presencia de las variantes de *TP53* se asoció a pacientes con anemia (p=0,030) y se observó una tendencia en pacientes con dependencia transfusional (p=0,093). Además, se asociaron a subtipos de SMD de alto riesgo (p=0,039), con IPSS-R de alto riesgo (p=0,001) y a la presencia de cariotipos complejos (p<0, 001).

1.4.6 Análisis de la supervivencia

1.4.6.1 Asociación entre las características clínicas y la supervivencia global y libre de transformación a LMA de los pacientes con SMD

Se analizó el valor pronóstico de los parámetros clínicos y demográficos recogidos de nuestra serie. En el análisis univariado, la edad avanzada (≥ 75 años), la anemia y la trombocitopenia al diagnóstico se asociaron a una peor supervivencia global (SG) (p=0,032, p=0,026 y p=0,011, respectivamente). Sin embargo, en los análisis de supervivencia libre de transformación a LMA (SLT) únicamente resultó significativo la trombocitopenia (p=0,013). El número de blastos también se asoció a una diferencia de SG y SLT a LMA entre los pacientes con <10% y $\geq 10\%$ (p=0,008, p=0,021, respectivamente). Ningún otro parámetro clínico o demográfico resultó significativo (Tabla 13).

Los subtipos de SMD según la OMS, se asociaron a una diferencia significativa en la SG y SLT a LMA según el subtipo de la OMS (p=0,006 y p<0,001, respectivamente). Al

considerar la clasificación de riesgo que proporciona el *score* IPSS-R, también se observaron diferencias significativas entre los subgrupos en cuanto a SG y SLT a LMA ($p < 0,001$ en ambos estudios) y también menores en los subtipos de mayor riesgo ($p < 0,001$ y $p = 0,001$, respectivamente).

En referencia a los estudios citogenéticos, no se observaron diferencias en la SG cuando se analizó la presencia de cariotipo alterado. Sin embargo, los pacientes con cariotipo complejo (≥ 3 alteraciones) presentaron una menor SG y SLT a LMA ($p < 0,001$ y $p = 0,003$, respectivamente).

Tabla 13. Resultados del análisis univariado de supervivencia global y de supervivencia libre de transformación a LMA teniendo en cuenta variables clínicas.

Variables	n	SG		SLT a LMA	
		SG 24m (%)	P	SLT 24m (%)	P
<75 años	52	80,5	0,032	85,6	0,278
≥75 años	54	49,8		72,8	
Sexo					
Hombre	72	63,9	0,184	82,9	0,988
Mujer	34	68,8		80,4	
Anemia					
Hemoglobina <10 (g/dL)	55	60,3	0,026	83,8	0,816
Hemoglobina ≥10 (g/dL)	51	70,9		79,5	
Trombopenia (10 ⁹ /L)					
<100.000 10 ⁹ /L plaquetas	49	49,8	0,011	73,0	0,013
≥100.000 10 ⁹ /L plaquetas	57	79,9		92,8	
Neutropenia (10 ⁹ /L)					
<1,8 10 ⁹ /L neutrófilos abs	53	57,3	0,424	73,7	0,696
≥1,8 10 ⁹ /L neutrófilos abs	48	70,3		88,3	
% Blastos en MO					
<10%	95	69,3	0,008	84,2	0,021
≥10%	11	36,4		60,0	
Subtipos SMD					
SMD-SA-DUL	10	100	0,006	100	0,002
SMD-del5q	9	85,7		100	
SMD-SA-DML	17	80,2		100	
SMD-DUL	6	66,7		100	
SMD-DML	29	63,2		84,2	
SMD-EB-I	23	53,6		61,6	
SMD-EB-II	11	27,3		45,0	
Riesgo Subtipos SMD					
Bajo Riesgo	72	75,7	<0,001	93,8	<0,001
Alto Riesgo	34	44,4		57,2	
IPSS-R					
Muy bueno	13	91,7	<0,001	100	<0,001
Bueno	30	81		95,7	
Intermedio	14	65,8		84,6	
Malo	7	17,9		37,5	
Muy malo	13	33,3		61,1	
Riesgo IPSS-R					
Bajo Riesgo	44	84,7	<0,001	97,1	0,001
Alto Riesgo	33	42,1		69,3	
Cariotipo					
Normal	32	64,5	0,237	88,2	0,391
Alterado	45	65,6		84,1	
Cariotipo complejo					
<3 alteraciones	34	80,7	<0,001	91,5	0,003
≥ 3 alteraciones	11	20,0		45,0	

SG: Supervivencia Global, SLT: Supervivencia libre de transformación, abs: absolutos.

1.4.6.2 Asociación entre las características genéticas y la supervivencia global y libre de transformación a LMA

Se analizó el valor pronóstico del estatus genético (<4 variantes vs ≥ 4 variantes) y de las variantes patogénicas que presentaron una recurrencia >5% con la excepción de los genes *IDH1/2* que se decidió incluir por su interés clínico (Tabla 14). Los pacientes que presentaron ≥ 4 variantes patogénicas mostraron una menor SG ($p=0,006$), mientras que no se encontraron diferencias con respecto a la SLT a LMA ($p=0,145$).

Los pacientes con el gen *SF3B1* afecto presentaron una mayor SG y una mayor SLT a LMA respecto a los pacientes con *SF3B1*^{wt} ($p=0,019$ y $p=0,036$, respectivamente). Sin embargo, no se observaron diferencias estadísticamente significativas ni en la SG ($p=0,343$) ni en la SLT a LMA ($p=0,202$) en los pacientes cuando se analizó la presencia de *SF3B1*^{mut} junto con otras variantes patogénicas con respecto al *SF3B1*^{wt}.

Al igual que el *SF3B1*, la presencia de variantes patogénicas en el gen *TET2* también se observó una tendencia a una mayor SG ($p=0,096$). Sin embargo, no se observaron diferencias significativas con respecto a la SLT a LMA.

Los pacientes con *ASXL1* alterado presentaron una menor SG y un mayor riesgo de progresión a LMA ($p=0,034$ y $p=0,010$, respectivamente), igual que los pacientes con *RUNX1* afecto ($p=0,019$ y $p=0,017$, respectivamente). Sin embargo, los pacientes con *U2AF1* alterado presentaron menor SG aunque no se observaron diferencias en cuanto a la SLT ($p=0,017$ y $p=0,647$).

Los pacientes con genes de la familia RAS alterados presentaron una tendencia a una menor SG ($p=0,095$). Sin embargo, no se encontraron diferencias en la SLT a LMA ($p=0,517$). No se encontraron diferencias significativas en la SG de los pacientes con los genes *DNMT3A*, *IDH1* alterados ($p=0,122$ y $p=0,819$, respectivamente), pero sí una menor SLT a LMA ($p=0,037$ y $p=0,032$, respectivamente).

Los pacientes con *TP53*^{mut} presentaron una menor SG ($p<0,001$) y una menor SLT a LMA ($p<0,001$). Además, en los casos *multi-hits*, (*TP53*^{multi-hits}, aquellos con más de un evento ya sean variantes patogénicas dobles o variantes patogénicas junto a la delección del gen en el otro alelo) presentaron una SLT a LMA menor respecto a los

pacientes con *TP53* con un evento monoalélico (*TP53*^{monoalélico}, un único alelo alterado ya sea una delección o una variante patogénica) ($p=0,014$) y respecto a los pacientes con *TP53* en estado nativo (*TP53*^{wt}) ($p<0,001$). Los pacientes con eventos múltiples presentaron una menor SG comparado con los pacientes con *TP53*^{monoalélico} ($p=0,047$) y también se encontraron diferencias significativas entre los pacientes *TP53*^{multi-hits} respecto a los que presentaron *TP53*^{wt} ($p<0,001$).

Tras el análisis de supervivencia de los genes individualmente, se detectó que los pacientes con la presencia de variantes patogénicas en uno de estos tres genes, *ASXL1*, *RUNX1* y *TP53*, presentaron un impacto negativo en la SG y SLT a LMA ($p<0,001$ y $p<0,001$, respectivamente).

No se encontraron asociaciones en cuanto al perfil mutacional de los pacientes tratados con AZA. Tampoco se observó una asociación entre la respuesta a este agente hipometilante con la vía de metilación del ADN ($p=0,462$) ni con alteraciones en *TET2* ($p=0,368$).

Tabla 14. Resultados del análisis univariado de SG y de SLT a LMA con variables genéticas.

Variables	n	SG		SLT a LMA	
		SG 24m (%)	P	SLT 24m (%)	P
<4 variantes	84	71,3	0,006	83,6	0,145
≥4 variantes	22	45,9		75,8	
<i>ASXL1</i> ^{wt}	77	78,9	0,034	88,3	0,010
<i>ASXL1</i> ^{mut}	22	51,3		60,2	
<i>DNMT3A</i> ^{wt}	86	68,7	0,122	85,7	0,037
<i>DNMT3A</i> ^{mut}	20	48,2		61,5	
<i>IDH1</i> ^{wt}	104	65,6	0,819	82,5	0,032
<i>IDH1</i> ^{mut}	2	50		50	
<i>IDH2</i> ^{wt}	101	65,2	0,874	82,4	0,151
<i>IDH2</i> ^{mut}	5	66,7		66,7	
<i>RUNX1</i> ^{wt}	89	69,3	0,019	84,7	0,017
<i>RUNX1</i> ^{mut}	17	44,4		66,5	
<i>SF3B1</i> ^{wt}	75	59,6	0,019	75,3	0,036
<i>SF3B1</i> ^{mut}	31	80,1		96,2	
<i>SF3B1</i> ^{wt}	75	59,6	0,010	75,3	0,044
<i>SF3B1</i> ^{mut}	14	100		100	
<i>SF3B1</i> ^{mut} + otros genes	17	60,3		92,3	
<i>SF3B1</i> ^{mut}	14	100	0,121	100	0,844
<i>SF3B1</i> + otros genes	17	60,3		92,3	
<i>SF3B1</i> ^{wt}	75	59,6	0,343	92,3	0,202
<i>SF3B1</i> ^{mut} + otros genes	17	60,3		75,3	
<i>SRSF2</i> ^{wt}	88	66,1	0,825	84,3	0,146
<i>SRSF2</i> ^{mut}	18	62,7		73	
<i>TET2</i> ^{wt}	78	60,9	0,096	80,5	0,369
<i>TET2</i> ^{mut}	28	78,3		85,6	
<i>TP53</i> ^{wt}	94	71,7	<0,001	85,4	<0,001
<i>TP53</i> ^{mut}	12	13,6		48,5	
<i>TP53</i> ^{wt}	94	71,7	<0,001	85,4	<0,001
<i>TP53</i> ^{monoalélico}	5	30		100	
<i>TP53</i> ^{multi-hit}	7	0		0	
<i>TP53</i> ^{monoalélico}	5	30	0,047	100	0,014
<i>TP53</i> ^{multi-hit}	7	0		0	
<i>U2AF1</i> ^{wt}	95	66,5	0,017	81,9	0,647
<i>U2AF1</i> ^{mut}	11	54		80	
<i>ASXL1/TP53/RUNX1</i> ^{wt}	62	80,3		95,5	
<i>ASXL1/TP53/RUNX1</i> ^{mut}	44	41,7	<0,001	58,7	<0,001

SG: supervivencia global, SLT: supervivencia libre de transformación a LMA, wt: *wild type*, mut: mutado, m: meses.

A continuación, se realizó el análisis multivariado incluyendo todos los parámetros con impacto significativo en la SG en el estudio univariado. El IPSS-R, el número de variantes patogénicas ≥4, variantes en los genes *TP53* y *U2AF1* se establecieron como variables con valor pronóstico independiente. Se validó el supuesto de riesgos proporcionales del modelo mediante el test basado en los residuos de Schoenfeld.

También se realizó el análisis multivariado incluyendo todos los parámetros con impacto en la SLT a LMA en el estudio univariado, sin detectar ninguna variable con valor pronóstico independiente. Los detalles se incluyen en la Tabla 15 y la Figura 21.

Tabla 15. Análisis multivariado de las variables con impacto en la SG.

Variables	P	HR	95% IC
IPSS-R	0,005	2,042	1,24-3,36
≥4 variantes patogénicas	0,019	4,691	1,29-17,12
TP53	0,030	5,973	1,19-30,11
U2AF1	0,011	6,086	1,51-24,47

SG: supervivencia global, HR:hazard ratio, IC: intervalo de confianza.

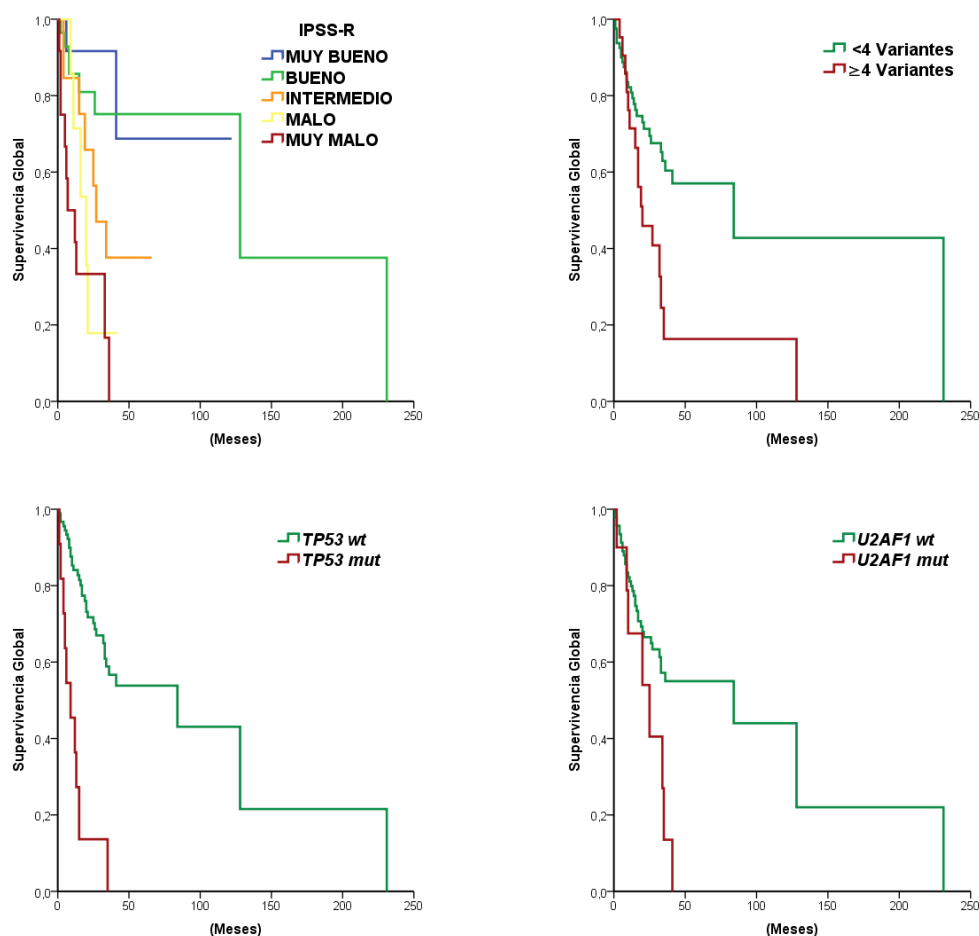


Figura 21. Supervivencia global estimada de las variables con impacto pronóstico independiente en el análisis multivariado.

2. RESULTADOS II - Evolución clonal y relación fenotipo-genotipo de los SMD: Papel del perfil mutacional y del microambiente.

2.1 DESCRIPCIÓN DE PACIENTES Y MUESTRAS

Se estudiaron 23 pacientes diagnosticados de SMD, incluidos en el trabajo anterior, de los que se dispuso de al menos dos muestras durante el transcurso de la enfermedad. Doce de los 23 pacientes (52,2%) evolucionaron a LMA (SMD-LMA), mientras que en 11 de ellos (47,8%) la enfermedad alcanzó una estabilidad (SMD-EE). Se definió a los pacientes con enfermedad estable a aquellos que no consiguieron alcanzar respuesta parcial tras tratamiento y/o en los que no se detectó una progresión ni empeoramiento clínico en menos de 8 semanas⁷⁸. La mediana de seguimiento fue de 21 meses (4-77 meses). Las características clínicas de las dos cohortes se encuentran resumidas en la Tabla 16.

Se analizaron un total de 51 muestras de médula ósea en las que se realizaron los estudios citogenéticos y los estudios de secuenciación masiva, y 55 muestras para los estudios inmunofenotípicos.

Tabla 16. Características clínicas de los 23 pacientes incluidos.

Características clínicas	SMD-LMA (N=12) N (%)	SMD-EE (N=11) N (%)
Edad		
Mediana (rango)	68 años (58-81)	73 años (47-81)
<70 años	7 (58,3)	5 (45,5)
Sexo		
Hombres	6 (50)	9 (81,8)
Mujeres	6 (50)	2 (18,2)
Subtipos de SMD		
SMD-SA-DML	0 (0)	1 (9,1)
SMD-DML	3 (25)	5 (45,5)
SMD-EB-I	5 (41,7)	2 (18,2)
SMD-EB-II	4 (33,3)	3 (27,3)
Estadio		
Diagnóstico	9 (75)	9 (79,2)
Seguimiento	2 (16,7)	2 (18,9)
Sin tratamiento	1 (50)	2 (100)
Post Tratamiento con azacitidina	1 (50)	0 (0)
Progresión a SMD-EB	1 (8,3)	0 (0)
Citopenias		
Anemia (Hemoglobina < 10g/dL)	5 (41,7)	9 (81,8)
Neutropenia (Neutrófilos <1,810 ⁹ /L)	10 (83,3)	9 (81,8)
Trombopenia (Plaquetas <100·10 ⁹ /L)	9 (75)	5 (45,5)
Blastos en MO		
<1%	0 (0)	3 (27,3)
1<5%	3 (25)	3 (27,3)
5-<10%	6 (50)	2 (18,2)
10-<20%	3 (25)	3 (27,3)
Cariotipo		
Informativo	7 (58,3)	9 (81,8)
Alterado	4 (57,1)	5 (55,6)
IPSS-R		
Bajo	1 (8,3)	3 (27,3)
Intermedio	2 (16,7)	2 (18,2)
Alto	3 (25)	2 (18,2)
Muy alto	1 (8,3)	2 (18,2)
No valorable	5 (41,7)	2 (18,2)
Tratamiento inicial		
Sin tratamiento	3 (25)	1 (9,1)
Eritropoyetina	0 (0)	5 (45,5)
Azacitidina	9 (75)	5 (45,5)
Nº de Tratamientos		
0	1 (8,3)	1 (9,1)
1	8 (66,7)	3 (27,3)
2	3 (25)	7 (63,6)
TPH	2 (16,7)	2 (18,2)
Exitus	11 (91,7)	7 (63,6)

TPH: trasplante de progenitores hematopoyéticos.

2.2 ESTUDIOS CITOGENÉTICOS: CARIOTIPO Y FISH

En 16 de los 23 pacientes (69,6%) se obtuvo información del cariotipo en el momento del diagnóstico de SMD. Nueve presentaron alteraciones citogenéticas, observándose en dos de ellos un cariotipo complejo.

En la primera muestra, se observó un mayor número de cariotipos no informativos en los SMD-LMA (n=5/12) con respecto a los SMD-EE (n=2/11). Por otro lado, la afectación del cromosoma 7 se halló más frecuentemente alterado en los SMD-LMA (n=4/12) que en los SMD-EE (N=1/11). En ambas cohortes el número de alteraciones citogenéticas fue similar (mediana de ambas cohortes=1; p=0,918), aunque se observaron más casos con cariotipo normal en la cohorte de SMD-EE que en los SMD-LMA (4 vs 2) (Figura 22).

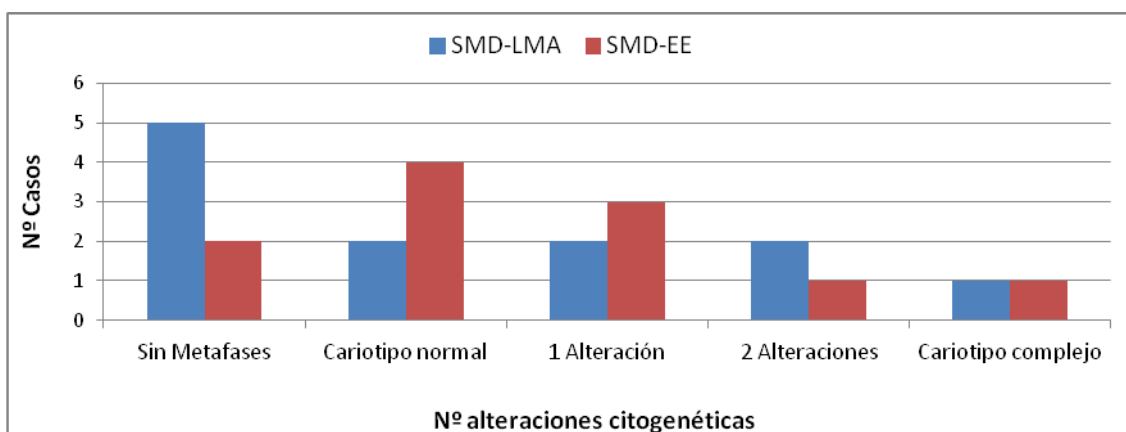


Figura 22. Número de alteraciones citogenéticas en la cohorte de SMD-LMA y de SMD-EE.

Los pacientes SMD-EE no presentaron cambios en el cariotipo durante su seguimiento, mientras que un 50% de los pacientes SMD-LMA (n=6) presentaron nuevas alteraciones citogenéticas durante la evolución de la enfermedad. En el paciente 3 (47,XY,+8[8]/46,XY[4]) se confirmó la evolución clonal citogenética de tipo lineal con la adquisición de los cromosomas 8, 21 y 22 (49,XY,+8,+8,+21,+22[13]/46,XY[3]). De los 5 pacientes restantes, en tres de ellos se detectó la misma alteración en la primera muestra mediante FISH y en los otros dos no se pudo establecer el modelo de evolución por no disponer de material para realizar la técnica.

El resultado del cariotipo en el momento del diagnóstico y durante el seguimiento de la enfermedad se encuentra resumido en las Tablas 26 y 27.

2.3 SECUENCIACIÓN SANGER DE *ASXL1*

Los resultados de las muestras al diagnóstico (n=18) se describen en “Resultados I”. De los 14 pacientes que se pudieron analizar, nueve (64,3%) presentaron la secuencia nativa, mientras que cinco (35,7%) presentaron las variantes patogénicas p.G646Wfs*12 (n=3) y p.E635Rfs*15 (n=2). Las características de estos pacientes se encuentran resumidas en la Tabla 12 de “Resultados I” (página 53) (pacientes 26, 49, 75, 78 y 95). Estos hallazgos se confirmaron en las muestras durante el seguimiento de la enfermedad.

2.4 SECUENCIACIÓN MASIVA

2.4.1 Genes y vías más frecuentemente alteradas

De los 23 pacientes analizados, se describió al menos una variante en todos los casos, con una mediana de 3 variantes por paciente (1-7). No se observaron diferencias significativas entre los distintos subtipos de SMD, ni tampoco entre los pacientes SMD-LMA y SMD-EE al diagnóstico (2,9 vs 3,3; p=0,452), ni al final del seguimiento (3,6 vs 3; p=0,573).

Respecto al perfil molecular de los pacientes SMD-EE (n=11), los genes más alterados fueron: *ASXL1* (n=4; 36,4%), *RUNX1*, *SF3B1*, *STAG2* y *TET2* (n=3; 27,3% cada uno), *PHF6*, *PTPN11*, *SRSF2* y *TP53* (n=2; 18,2%). En los casos en los que se detectó una única variante, estaban representados los genes *BCOR*, *CBL*, *DNMT3A*, *ETV6*, *FLT3*, *KRAS*, *NF1*, *NPM1*, *NRAS* y *U2AF1* (n=1; 9,1% cada uno). En el caso de los SMD-LMA (n=12), los genes más frecuentemente alterados fueron: *SRSF2* (n=5; 41,7%), *ASXL1*, *RUNX1* y *TET2* (n=3; 25% cada uno), *BCOR*, *DNMT3A*, *IDH2*, *STAG2*, *TP53* y *U2AF1* (n=2; 16,7% cada uno) e *IDH1*, *NPM1*, *RAD21* y *SF3B1* (n=1; 8,3% cada uno) (Figura 23).

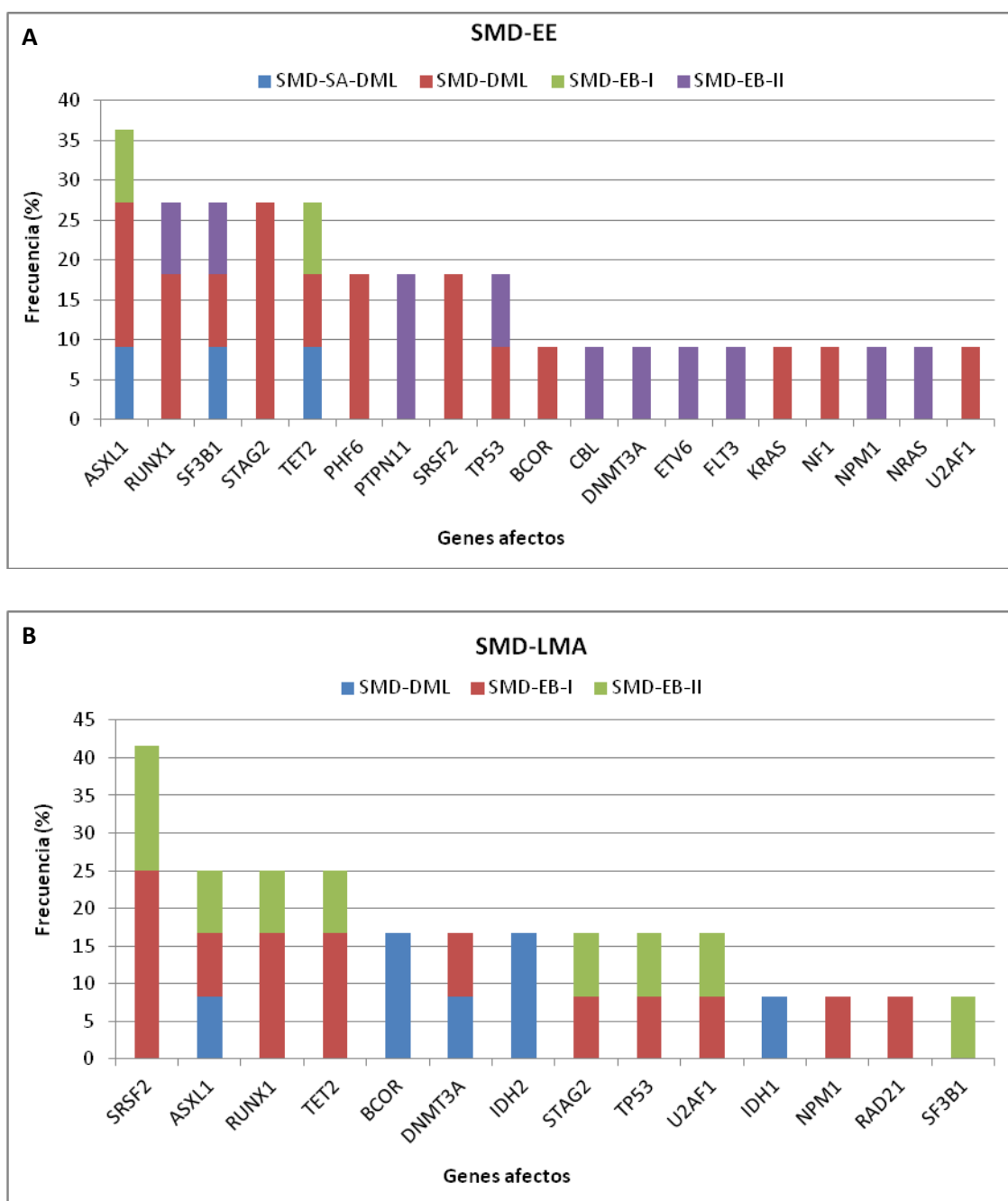


Figura 23. Frecuencia de los genes más frecuentemente alterados en los SMD-EE (A) y los SMD-LMA (B).

Las vías celulares más afectas en los SMD-EE fueron: la vía del *splicing* (n=6; 54,5%); los factores de la transcripción y los genes de la familia RAS (n=5; 45,5% cada uno); los genes relacionados con la metilación del ADN y los remodeladores de la cromatina (n=4 36;4% cada uno); los genes de las cohesinas (n=3; 27,3%); los genes de la reparación del ADN (n=2; 18,2%) y los genes receptores quinasas junto con los genes de otras vías (n=1; 9,1% cada uno). En los SMD-LMA, igual que en los SMD-EE, la vía

más alterada fue la vía del *splicing* (n=8; 66,7%), seguida de la vía de metilación del ADN (n=7; 58,3%), los factores de la transcripción, los remodeladores de la cromatina y los relacionados con las cohesinas (n=3; 25% cada uno), los genes de reparación del ADN (n=2; 16,7%) y otras vías (n=1; 8,3%) (Figura 24).

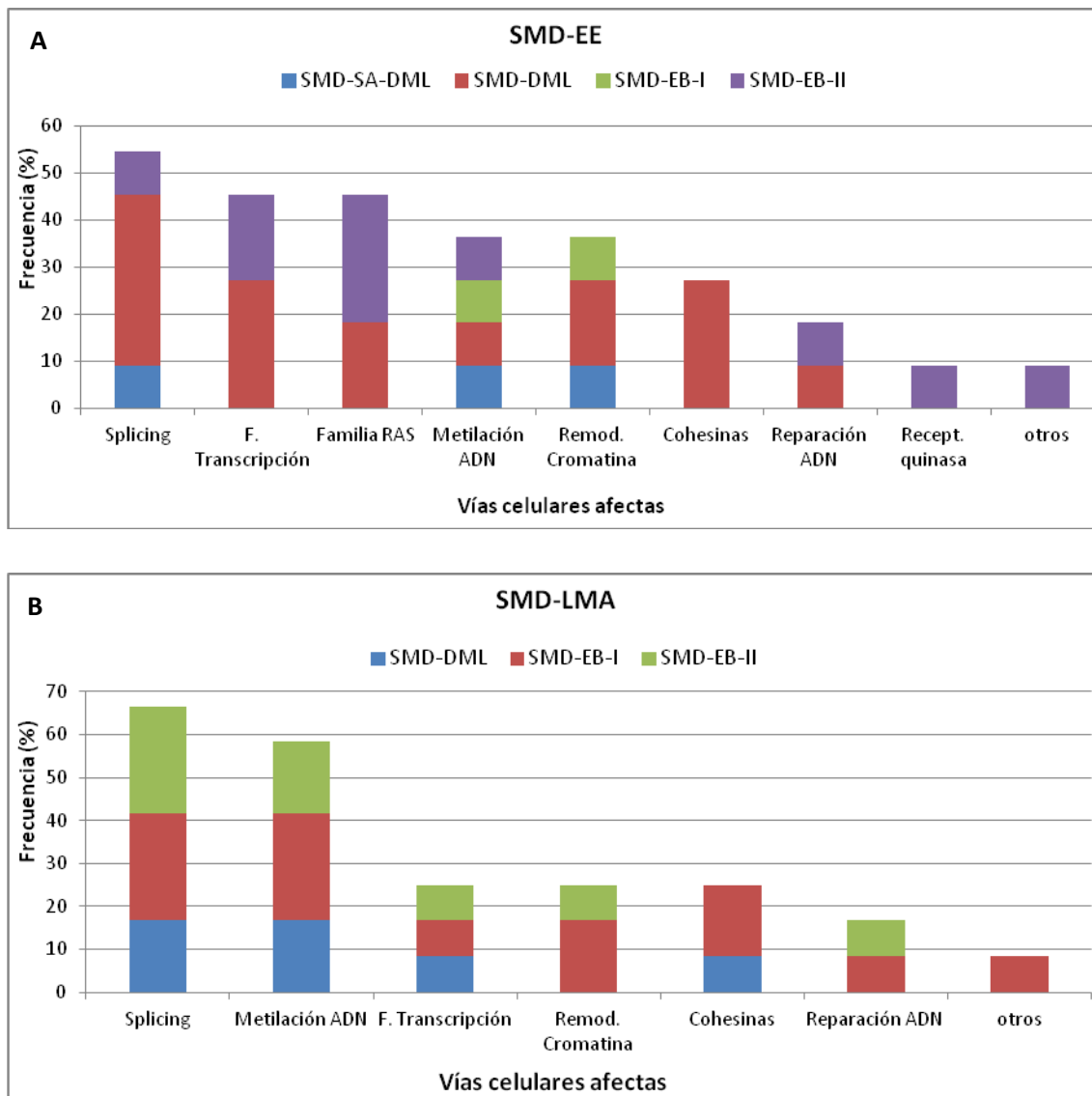


Figura 24. Vías más frecuentemente alteradas en los SMD-EE (A) y los SMD-LMA (B).

F.: Factores, Remod.: remodeladores, Recept.: receptores.

2.4.2 Evolución clonal

En los SMD-EE (n=11), ocho pacientes mantuvieron las mismas variantes patogénicas en igual o menor frecuencia alélica (VAF), demostrando una respuesta al tratamiento. Sin embargo, en dos pacientes se observó el aumento de las VAF de las variantes patogénicas detectadas, coincidiendo con la progresión de la enfermedad a subtipos

de mayor riesgo. En uno de los pacientes se detectó la adquisición de una nueva variante patogénica en el gen *NRAS*, a una frecuencia alélica minoritaria (5%), y que falleció sin poder confirmar la evolución de la enfermedad a LMA (Figura 25).

Con respecto a los SMD-LMA (n=12), todos mostraron cambios en las variantes detectadas, cuatro mostraron aumento en las VAF en las variantes inicialmente detectadas y ocho (66,7%) mostraron la adquisición de nuevas variantes patogénicas. La adquisición de estas variantes patogénicas en diferentes etapas se produjo en forma de evolución clonal lineal (pacientes 1, 3, 4, 7 y 9), o bien, como una evolución clonal ramificada (pacientes 2, 5, 6, 8 y 11) (Figura 26).

Los mecanismos de evolución clonal se representaron mediante el paquete FishPlot del programa estadístico R⁸², en el que se estimaron las relaciones subclonales mediante las frecuencias alélicas, su aumento o disminución, junto con la integración de los datos del cariotipo del paciente. Las líneas punteadas representan los momentos de obtención y análisis de la muestra. Por otro lado, las líneas blancas señalan el momento en el que se estima que se produjo un cambio en el perfil molecular del paciente, a partir de las VAF y el tipo de gen alterado (Figuras 27 y 28). Los detalles de los pacientes SMD-LMA y SMD-EE junto con las variantes patogénicas detectadas se resumen en las Tablas 17 y 18.

CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DE LOS SÍNDROMES MIELODISPLÁSICOS

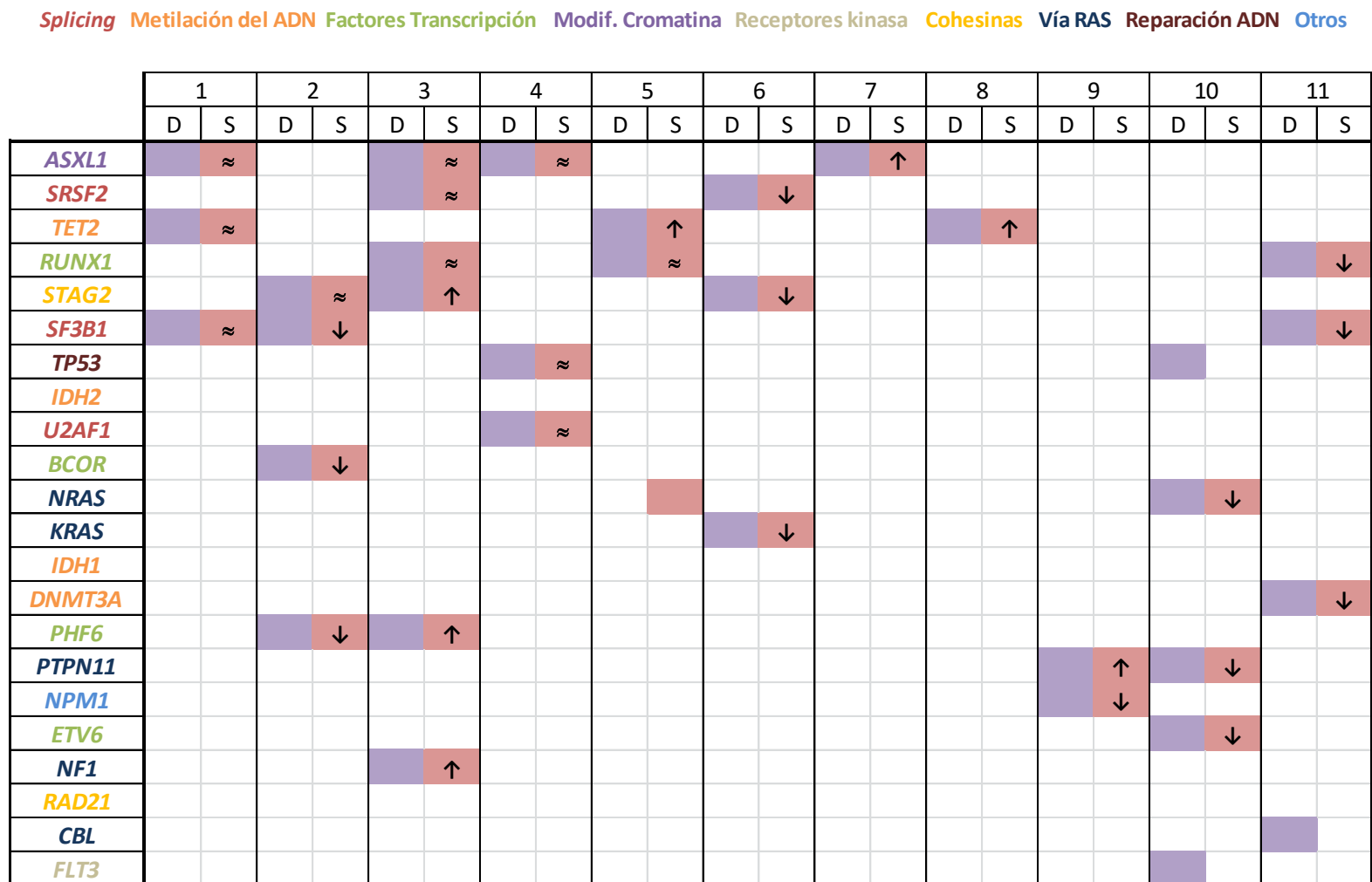


Figura 25. Perfil mutacional de los pacientes con SMD-EE. Variantes patogénicas al diagnóstico (D) (■) y al seguimiento (S) (■) y si aumentan (↑), disminuyen (↓) o se mantienen (≈) las VAF.

Splicing Metilación del ADN Factores Transcripción Modif. Cromatina Receptores kinasa Cohesinas Vía RAS Reparación ADN Otros

	1		2			3		4		5		6			7			8			9		10		11		12	
	D	T	D	S	T	D	T	D	T	D	T	D	S	T	D	S	T	D	S	T	D	T	D	T	D	T	D	T
ASXL1				↓	↑											≈	≈							≈				
SRSF2				↓	↑		↑									≈	≈							≈		≈		
TET2				↓	↑		↑							↓											*			
RUNX1							↑																		≈			
STAG2																	↑							≈				
SF3B1																			↓									
TP53											↑																↑	
IDH2					≈											≈	≈							≈				
U2AF1		↑																										
BCOR							↑																		≈			
NRAS																												
KRAS																				↑								
IDH1																												
DNMT3A		↑																										
PHF6																												
PTPN11																												
NPM1									↑																			
ETV6																												
NF1																												
RAD21							↑																					
CBL																												
FLT3																												

Figura 26. Perfil mutacional de los pacientes de SMD-LMA. Variantes patogénicas al diagnóstico (D) (■), en el seguimiento (S) (■) y en la transformación (T) (■) y si aumentan (↑), disminuyen (↓) o se mantienen (≈) las VAF. * Diversas variantes del mismo gen con diferente evolución.

CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DE LOS SÍNDROMES MIELODISPLÁSICOS

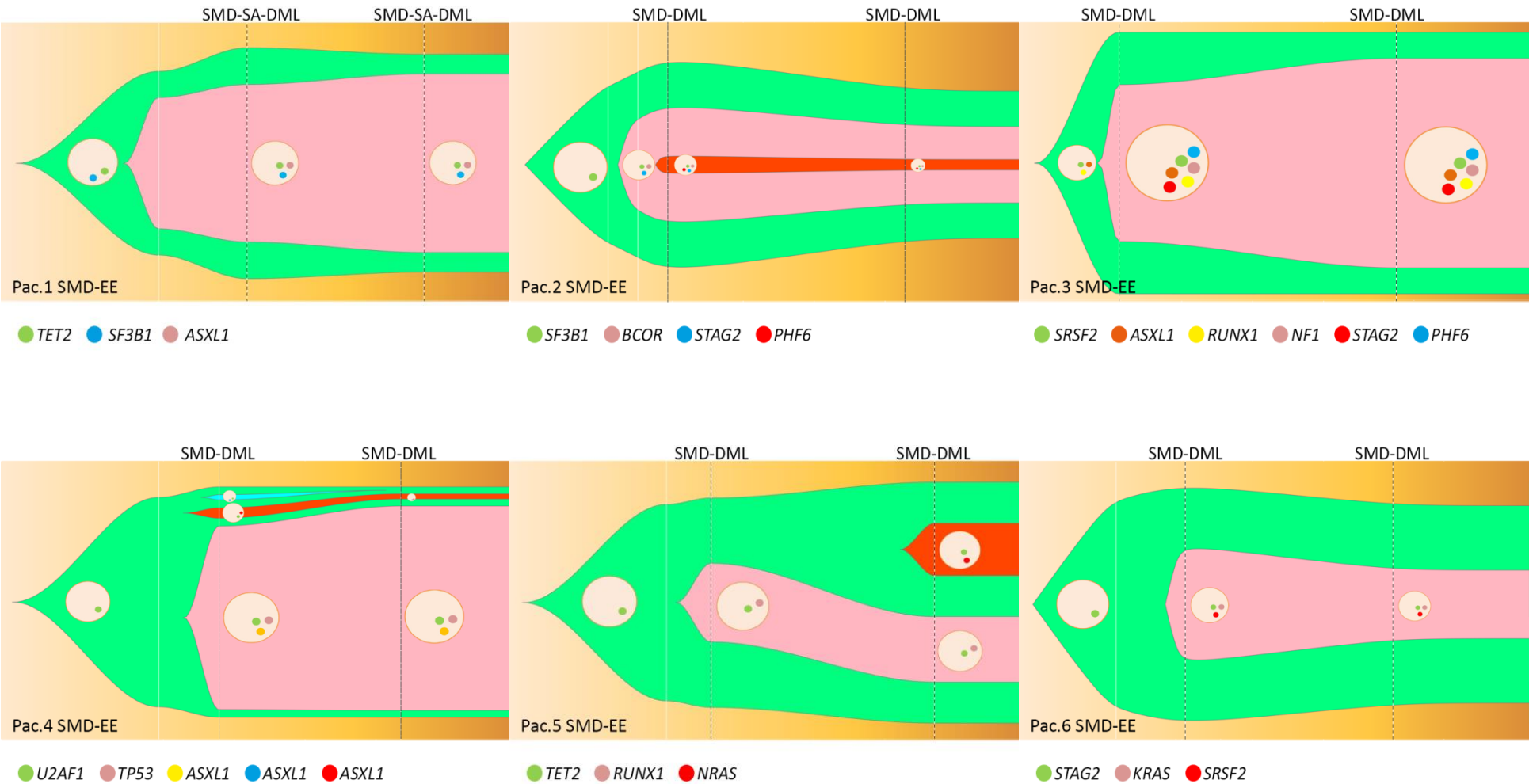


Figura 27. Gráficos FishPlot representando la arquitectura clonal de los 11 pacientes que mantuvieron enfermedad estable (SMD-EE).

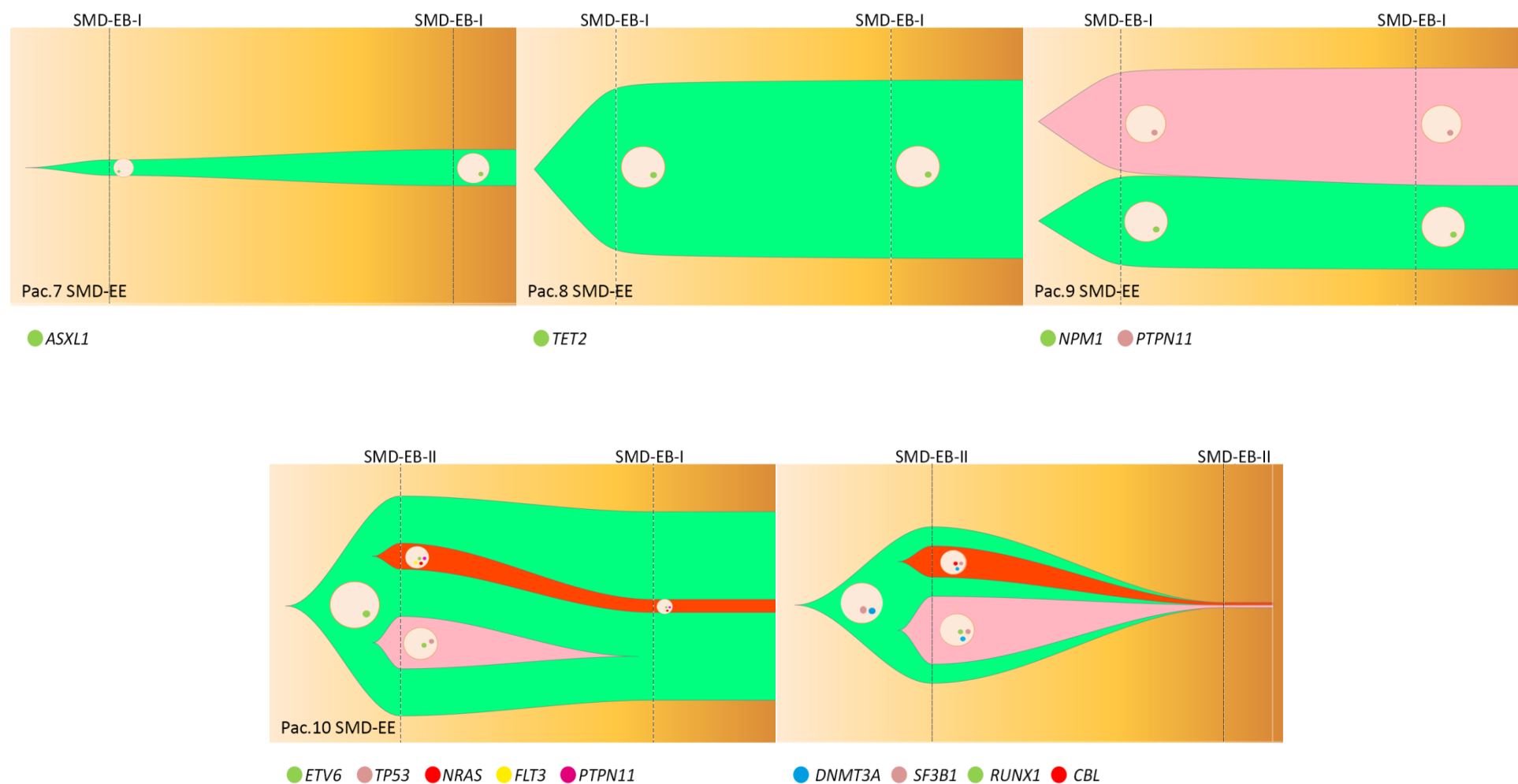


Figura 27. Continuación.

CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DE LOS SÍNDROMES MIELODISPLÁSICOS

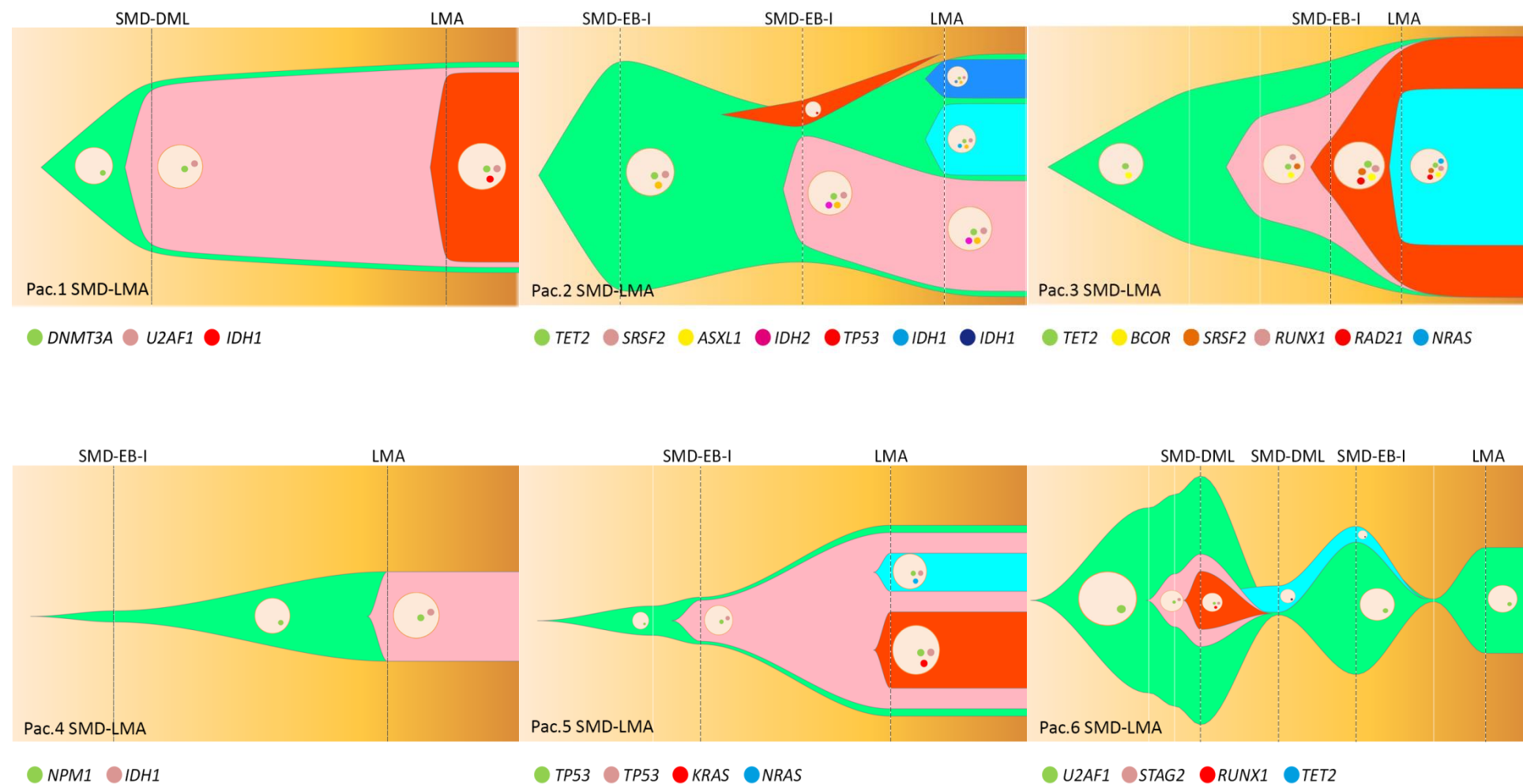


Figura 28. Gráficos FishPlot representando la arquitectura clonal de los 12 pacientes con evolución leucémica (SMD-LMA).

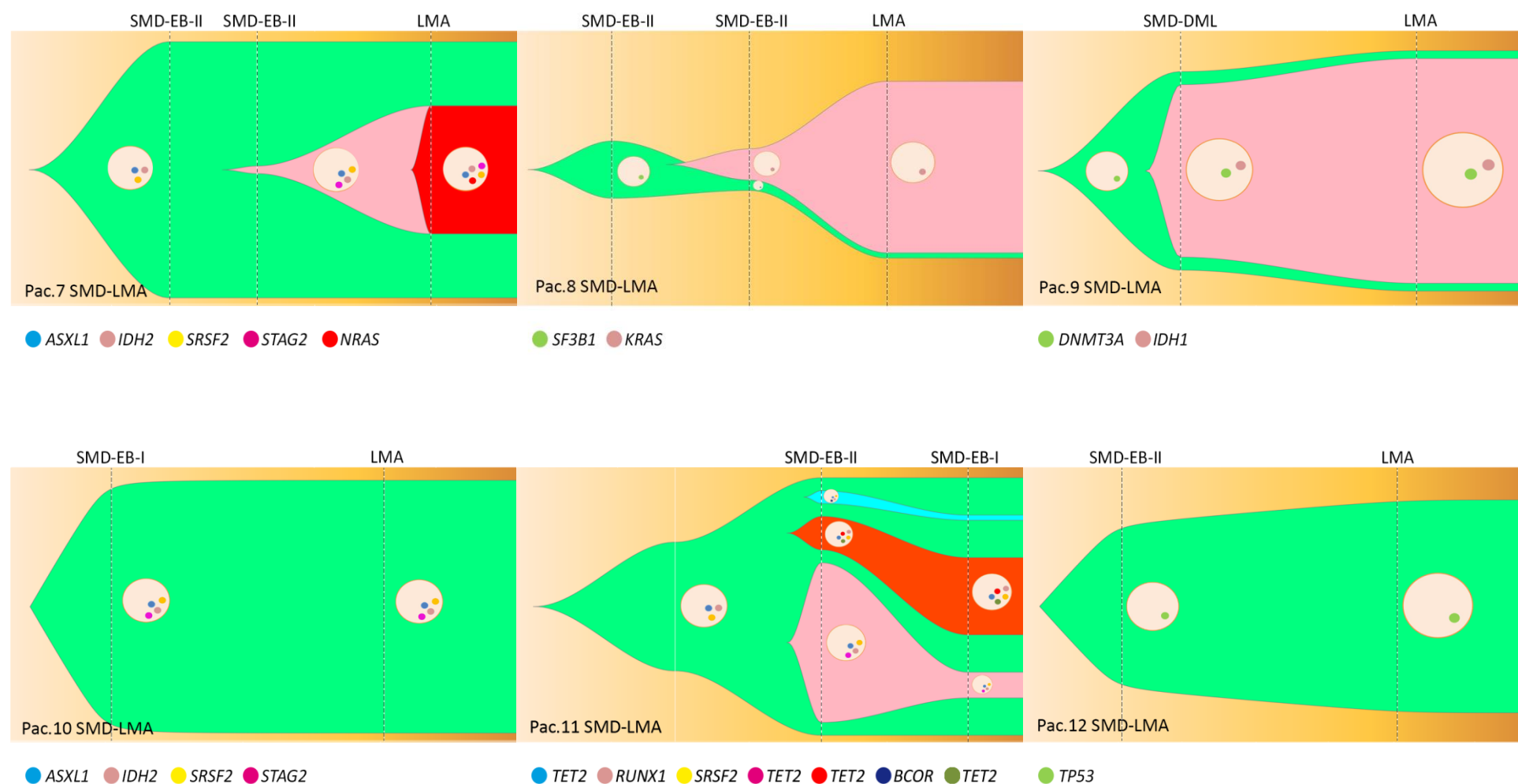


Figura 28. Continuación.

Tabla 17. Resumen de los detalles de las variantes patogénicas detectadas en los pacientes SMD-EE.

Gen	Localización	Variante CDS	Variante AA	Estadio / Meses (%) / Tratamiento	
				VAF (%)	
Paciente 1 (Mujer)				SMD-SA-DML (Dx) Sin metafases	SMD-SA-DML (6m) / post-EPO Sin metafases
TET2	4q24	c.3018_3019insCT	p.T1007Lfs*27	88%	83%
SF3B1	2q33.1	c.1986C>A	p.H662Q	43%	47%
ASXL1	20q11.21	c.1934dupG	p.G646Wfs*12	30%*	34%
Paciente 2 (Hombre)				SMD-DML (Dx) 46,XY[20]	SMD-DML (5m) / Post-AZA 46,XY[20]
SF3B1	2q33.1	c.1998G>C	p.K666N	42%	28%
BCOR	Xp11.4	c.4654_4654delT	p.Y1552fs	49%	29%
STAG2	Xq25	c.3349C>T	p.Q1117*	46%	28%
PHF6	Xq26.2	c.863C>T	p.A288V	7%	4%
Paciente 3 (Hombre)				SMD-DML (Dx) 46,XY[20]	SMD-EB-I (5m) / Post-EPO 46,XY[20]
SRSF2	17q25.1	c.284C>A	p.P95H	54%	52%
NF1	17q11.2	c.528T>A	p.D176E	53%	60%
ASXL1	20q11.21	c.1900_1922del	p.E635Rfs*15	50%*	50%*
RUNX1	21q22.12	c.319C>T	p.R107C	45%	48%
STAG2	Xq25	c.697_698insT	p.A234fs	71%	82%
PHF6	Xq26.2	c.673C>T	p.R225*	57%	81%
Paciente 4 (Mujer)				SMD-DML (21m) / Post-EPO Sin Metafases	SMD-DML (32m) / Pre-AZA Sin Metafases
U2AF1	21q22.3	c.470A>C	p.Q157P	44%	44%
TP53	17p13.1	c.823T>C	p.C275R	37%	42%
ASXL1	20q11.21	c.1934dupG	p.G646Wfs*12	34%	36%
ASXL1	20q11.21	c.2535delC	p.S846Vfs*21	1,4%	-
ASXL1	20q11.21	c.2823delT	p.D943lfs*2	2,3%	1,5%
Paciente 5 (Hombre)				SMD-DML (Dx) 46,XY[20]	SMD-DML (5m) / Post-EPO 46,XY[20]
TET2	4q24	c.5393C>G	p.S1798*	40%	46%
RUNX1	21q22.12	c.958C>T	p.R320T*	8%	6%
NRAS	1p13.22	c.35G>C	p.G12A	-	5%
Paciente 6 (Hombre)				SMD-DML (13) /Sin ttmo. 46,XY,ider(20)(q10),del(20)(q11q13)[13]/46,XY[7]	SMD-DML(19m) / Sin ttmo. 46,XY,ider(20)(q10),del(20)(q11q13)/46,XY
STAG2	Xq25	c.2318_2322delAACAT	p.Q773fs	92%	75%
KRAS	12p12.1	c.35G>T	p.G12V	24%	18%
SRSF2	17q25.1	c.283C>A	p.P95T	20%	18%
Paciente 7 (Hombre)				SMD-EB-I (Dx) 46,XY,t(1;17)(p35;q21),del(7)(q22q32),t(9;14)(q34;q11)[5]/46,XY	SMD-EB-I (10m) / Post-AZA 46,XY,t(1;17)(p35;q21),del(7)(q22q32),t(9;14)(q34;q11)/46,XY
ASXL1	20q11.21	c.1494_1498delACGTG	p.R499fs	3%	7,5%
Paciente 8 (Hombre)				SMD-EB-II (10m) / Post-EPO 46,XY,del(5)(q13q33)[9]/46,XY[7]	SMD-EB-I (26m) /Pre-Lena 46,XY,del(5)(q13q33)[4]/46,XY[6]
TET2	4q24	c.3986T>C	p.L1329P	33%	37%
Paciente 9 (Hombre)				SMD-EB-I (Dx) 47,XY,+21[7]/46,XY[13]	SMD-EB-I (6m) / Post-AZA 47,XY,+21[11]/46,XY[9]
PTPN11	12q24.13	c.923A>G	p.N308S	40%	45%
NPM1	5q35.1	c.860_863dupTCTG	p.W288Cfs*?	36%	32%
Paciente 10 (Hombre)				SMD-EB-II (Dx) 46,XY,t(6;9)(p22;q34)/46,XY	SMD-EB-I (4m) / Post-AZA 46,XY,t(6;9)(p22;q34)[13]/46,XY[20]
ETV6	12p13.2	c.527T>C	p.I176T	42%	36%
TP53	17p13.1	c.578A>G	p.H193R	5%	-
NRAS	1p13.22	c.38G>A	p.G13D	2%	IM
FLT3	13q12.2	c.2503G>T	p.D835Y	1,1%	-
PTPN11	12q24.13	c.206A>T	p.E69V	1,1%	IM
Paciente 11 (Hombre)				SMD-EB-II (4m) / Post-AZA 46,XY[20]	SMD-EB-II (8m) /Post-AZA 46,XY[20]
RUNX1	21q22.12	c.630_631insA	p.D211fs	52%	IM
DNMT3A	2p23.3	c.891G>A	p.W297*	29%	IM
SF3B1	2q33.1	c.1874G>T	p.R625L	28%	IM
CBL	11q23.3	c.1111T>A	p.Y371N	6%	-

*VAF orientativa (Secuenciación *Sanger*), Dx:Diagnóstico., IM: identificación manual

Tabla 18. Resumen de los detalles de las variantes patogénicas detectadas en los pacientes SMD-LMA.

Gen	Localización	Variante CDS	Variante AA	Estadio / Meses (m) / Tratamiento			
				VAF (%)			
Paciente 1 (Mujer)				SMD-DML (Dx) 46,XX[15]	LMA (16m) / Sin tratamiento 46,XX,del(5)(q15q33)[16]/46,XX[7]		
DNMT3A	2p23.3	c.2060T>G	p.V687G	34%	40%		
U2AF1	21q22.3	c.101C>T	p.S34F	32%	38%		
IDH1	2q34	c.394C>T	p.R132C	-	37%		
Paciente 2 (Mujer)				SMD-EB-I (Dx) 47,XX,t(X;20)(q13;q13),+8[12]	SMD-EB-I (9m) / Sin tratamiento 47,XX,t(X;20)(q13;q13),+8[6]/46,XX[3]	LMA (16m) / Post-AZA 47,XX,t(X;20)(q13;q13),+8[6]/46,XX[3]	
TET2	4q24	c.4521_4521delG	p.A1508fs	80%	22%	60%	
SRSF2	17q25.1	c.284C>A	p.P95H	48%	22%	44%	
ASXL1	20q11.21	c.1934dupG	p.G646Wfs*12	35%*	15%*	36%	
IDH2	15q26.1	c.419G>A	p.R140Q	-	21%	20%	
TP53	17p13.1	c.769C>G	p.L257V	-	5%	-	
IDH1	2q34	c.394C>T	p.R132C	-	-	13%	
IDH1	2q34	c.395G>A	p.R132H	-	-	7%	
Paciente 3 (Hombre)				SMD-EB-I (15m) / Post-AZA 47,XY,+8[8]/46,XY[4]	LMA (26m) / Post-Aza 49,X,-Y,+8,+8,+21,+22[13]/46,XY[3]		
BCOR	Xp11.4	c.1988_1988delC	p.P663fs	68,5%	88%		
RUNX1	21q22.12	c.611G>A	p.R204Q	40%	55%		
TET2	4q24	c.3818G>A	p.C1273Y	31%	40%		
SRSF2	17q25.1	c.284C>T	p.P95L	26%	50%		
RAD21	8q24.11	c.9C>G	p.Y3*	10%	54%		
NRAS	1p13.22	c.34G>C	p.G12R	-	30%		
Paciente 4 (Hombre)				SMD-EB-I (Dx) 46,XY [20]	LMA (9m) / Post-Aza 46,XY[20]		
NPM1	5q35.1	c.860_863dup	p.W288Cfs*?	2%	16%		
IDH1	2q34	c.395G>A	p.R132H	-	18%		
Paciente 5 (Mujer)				SMD-EB-I (Dx) 46,XY[20]// FISH del5q, -7 positivo	LMA (3m) / Sin tratamiento 43=44,XX,t(1;9)(p32;p24),del(5)(q13;q33),-7,+8,del(12)(q24),-17,-18,-21[cp17]		
TP53	17p13.1	c.351_352insG	p.T118fs	8%	32%		
TP53	17p13.1	c.659A>G	p.Y220C	7%	30%		
KRAS	12p12.1	c.35G>T	p.G12V	-	14%		
NRAS	1p13.22	c.35G>A	p.G12D	-	7%		

*VAF orientativa (Secuenciación Sanger), Dx: Diagnóstico.

CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DE LOS SÍNDROMES MIELODISPLÁSICOS

Paciente 6 (Hombre)				SMD-DML (9m) 46,XY,del(20)(q12)[16]/46,XY[2]	SMD-DML (16m) / Post-AZA 46,XY[20]	SMD-EB-I (29m) 46,XY,del(20)(q12)[6]/46,XY	LMA (39m) / Post-TPH Sin Metafasas
U2AF1	21q22.3	c.101C>T	p.S34F	48%	-	25%	20%
STAG2	Xq25	c.1840C>T	p.R614*	35%	-	-	ND
RUNX1	21q22.12	c.484A>G	p.R162G	11%	-	-	-
TET2	4q24	c.5390T>A	p.L1797*	-	5%	3,4%	-
Paciente 7 (Hombre)				SMD-EB-II (Dx) 46,XY[5]//FISH 5q,7q negativo	SMD-EB-II (5m) / Post-Aza 46,XY[15]	LMA (8m) Post-Aza 46,XY,+8[15]/46,XY[5]	
ASXL1	20q11.21	c.1900_1922del	p.E635Rfs*15	50%*	50%*	50%*	
IDH2	15q26.1	c.419G>A	p.R140Q	49%	49%	50%	
SRSF2	17q25.1	c.284C>A	p.P95H	51%	50%	53%	
STAG2	Xq25	c.3097C>T	p.R1033*	-	3,24%	50%	
NRAS	1p13.22	c.37G>C	p.G13R	-	-	25%	
Paciente 8 (Mujer)				SMD-EB-II (Dx) Sin metafasas// FISH del5q, -7 positivo	SMD-EB-II (32) / Sin tratamiento 46,XX,del(5)(q13q33)[16]/45,XX,del(5)(q13q33),-7[10]/46,XX	LMA (34m) / Post-Aza 45,XX,del(5)(q13q33),-7[12]/46,XX,del(5)(q13q33)[1]	
SF3B1	2q33.1	c.2098A>G	p.L700E	11%	2%	-	
KRAS	12p12.1	c.35G>A	p.G12D	-	6%	33%	
Paciente 9 (Mujer)				SMD-DML (46m) / Sin tratamiento 46,XX[20] //FISH del(7q)	LMA (55m) / pre-TPH 46,XX,del(7)(q21)[17]/46,XX[3]		
DNMT3A	2p23.3	c.1040T>C	p.L347P	39%	46%		
IDH1	2q34	c.394C>T	p.R132C	33%	42%		
Paciente 10 (Hombre)				SMD-EB-I (17m) / Post-Aza 46,XY[18]	LMA (21m) / pre-Flagida 46,XY[20]		
ASXL1	20q11.21	c.1934dupG	p.G646Wfs*12	50%*	50%*		
IDH2	15q26.1	c.419G>A	p.R140Q	47%	52%		
SRSF2	17q25.1	c.284C>T	p.P95L	50%	53%		
STAG2	Xq25	c.1122_1122delA	p.I375fs	92%	97%		
Paciente 11 (Hombre)				SMD-EB-II (Dx) Sin Metafasas	SMD-EB-I (5m) / Post-Aza 46,XY[20]	LMA (6m) / Post-Aza Sin Metafasas	
TET2	4q24	c.1691G>A	p.W564*	52%	52%	ND	
SRSF2	17q25.1	c.284C>G	p.P95R	49%	48%		
RUNX1	21q22.12	c.619_619delC	p.R207fs	46%	45%		
TET2	4q24	c.4875_4876insA	p.T1626fs	32%	5%		
TET2	4q24	c.2728C>T	p.Q910*	7%	16%		
BCOR	Xp11.4	c.3490C>T	p.R1164*	5%	2%		
TET2	4q24	c.5712T>G	p.H1904Q	3%	11%		
Paciente 12 (Mujer)				SMD-EB-I (Dx) 46,XX,del(5)(q13q33),-7,-9,-10,-12,der(17)t(7;17)(p10;q10),der(19)t(19;?)(p13.3;),+4mar[10]	LMA (11m) / Post-Aza 46,XX,del(5)(q13q33),-7,der(10)t(10;?)(p11;?)-12,der(17)t(7;17)		
TP53	17p13.1	c.731G>T	p.G244V	64%	82%		

2.4.3 Asociación entre los parámetros clínicos y genéticos y el riesgo de transformación a LMA

Se analizaron las diferencias entre los parámetros clínicos en las dos series estudiadas, los pacientes con SMD-LMA y aquellos con SMD-EE. No se encontraron diferencias entre los dos grupos en cuanto a edad, niveles de hemoglobina, plaquetas, leucocitos, neutrófilos ni en el porcentaje de blastos en MO. Sin embargo, se encontró significación estadística en el valor del volumen corpuscular medio (VCM) (90,8 vs 103,9; $p < 0,001$). Este hallazgo se confirmó en la cohorte de 106 pacientes del primer trabajo, asociándose los valores menores de VCM a la transformación a LMA (92,4 vs 102,4; $p = 0,001$) (Tabla 19).

Tabla 19. Características de los pacientes de las cohortes de SMD-LMA y SMD-EE.

Parámetros	Media SMD-LMA	Media SMD-EE	P
Edad (años)	69,6	68,1	0,668
Hb (g/dL)	9,9	9,1	0,237
VCM (fl)	90,8	103,8	<0,001
Plaquetas ($10^9/L$)	81.917	119.364	0,131
Leucocitos ($10^9/L$)	17,1	30,9	0,580
Neutrófilos ($10^9/L$)	0,97	0,92	0,439
Blastos en MO (%)	7,7	5,5	0,320
Nº de variantes	2,87	3,27	0,452

Hb.: hemoglobina, VCM: volumen corpuscular medio, Nº: número.

En referencia a los parámetros genéticos, tampoco se observaron diferencias en el número de variantes patogénicas detectadas. Sin embargo, la adquisición de nuevas variantes se asoció con la transformación a LMA de manera significativa ($p = 0,004$). Tras el análisis estadístico, se detectó como los pacientes con alguno de estos genes (*IDH1/2*, genes de la familia RAS y *TP53*) adquiridos en la evolución de la enfermedad se asociaron a un mayor riesgo de transformación a LMA ($p = 0,012$) (Tabla 20).

Tabla 20. Parámetros comparados y su asociación con la transformación a LMA.

Parámetros	n	Transf. a LMA	P
<i>SRSF2</i> ^{mut} vs <i>SRSF2</i> ^{wt}	7 16	5 7	0,371
<i>SF3B1</i> ^{mut} vs <i>SF3B1</i> ^{wt}	4 19	1 11	0,316
<i>ASXL1</i> ^{mut} vs <i>ASXL1</i> ^{wt}	7 12	3 7	0,650
<i>TET2</i> ^{mut} vs <i>TET2</i> ^{wt}	6 17	3 9	1
<i>RUNX1</i> ^{mut} vs <i>RUNX1</i> ^{wt}	6 17	3 9	1
<i>STAG2</i> ^{mut} vs <i>STAG2</i> ^{wt}	5 13	2 8	0,608
Adquisición ^{mut} vs No adquisición ^{mut}	9 13	8 3	0,004
<i>IDH1/2, TP53, RAS</i> ^{mut} vs <i>IDH1/2, TP53, RAS</i> ^{wt}	14 8	10 1	0,012

Mut: mutado, wt: *wild type*, Transf.: transformación a LMA.

Los genes que se adquirieron *de novo* en la evolución clonal (n=13) incluyeron a *NRAS* e *IDH1* (n=4; 30,8%), *KRAS* (n=2; 15,4%), *IDH2*, *TP53* y *STAG2* (n=1; 7,7 en cada caso). En consecuencia, las vías funcionales que más intervinieron en este proceso fueron la vía de los genes de la familia RAS (n=6; 46,1%) y los genes de la metilación de ADN de adquisición tardía (n=5; 38,5%).

2.4.4 Análisis de la supervivencia

La evolución clonal molecular detectada por secuenciación masiva presenta un impacto en la SLT a LMA (p=0,004), aunque no fue significativa estadísticamente el impacto sobre la SG (p=0,126). En relación a los pacientes con la presencia de variantes patogénicas en los genes *IDH1/2*, genes de la familia RAS y *TP53*, se observó una tendencia a un mayor riesgo de transformación a LMA (Tabla 21).

Tabla 21. Parámetros analizados en los estudios de SG y SLT a LMA.

Variables	n	% SG (24m)	P	n	% SLT (24m)	P
No Adquisición variantes	13	61,5%	0,126	13	90%	0,004
Adquisición variantes	9	33,3%		9	38,1%	
<i>IDH1/2, RAS, TP53</i> ^{wt}	8	62,5%	0,385	8	100%	0,056
<i>IDH1/2, RAS, TP53</i> ^{mut}	14	42,9%		14	50,6%	

SG: supervivencia global, SLT: supervivencia libre de transformación a LMA, m: meses, wt: *wild type*, mut: mutado.

2.5 ANÁLISIS MEDIANTE CITOMETRÍA DE FLUJO

2.5.1 Relación fenotipo-genotipo y evolución clonal

Se analizó el fenotipo en MO de todos los pacientes al diagnóstico. Entre los hallazgos encontrados, destacó la alteración en la granulación (SSC/CD45) en todos los pacientes, con un 21,7% de pacientes con el patrón muy alterado. En cuanto a las características de maduración (CD16/CD13/CD11b) también resultó un patrón alterado en todos los pacientes, estando muy alterado en un 8,7% de ellos. Los detalles de los patrones en ambas cohortes, SMD-EE y SMD-LMA, se resumen en la Tabla 22.

Tabla 22. Patrones alterados en los pacientes SMD-EE y SMD-LMA.

	Patrón SSC/CD45		Patrón CD16/CD13/CD11b	
	SMD-EE	SMD-LMA	SMD-EE	SMD-LMA
Ligeramente Alterado	1	0	3	2
Alterado	9	8	8	8
Muy Alterado	1	4	0	2

También se estudió el fenotipo en el seguimiento de cada paciente, no observándose ningún cambio, entendido como la modificación en la intensidad de al menos un marcador, asociado a los cambios genéticos observados en los pacientes con evolución clonal.

2.5.2 Asociación de células mesenquimales, respuesta al tratamiento con azacitidina y adquisición de variantes patogénicas

El análisis de marcadores de fenotipo mencionados anteriormente no reveló ninguna asociación significativa con el genotipo de los pacientes analizados en esta cohorte. Sin embargo, se observó el aumento de una población brillante (CD13^{high}), negativa para el marcador pan-leucocitario CD45 (CD45^{neg}), negativo para CD117 (CD17^{neg}) y expresión baja o negativa del marcador CD34 (CD34^{neg/low}). El estudio de estos marcadores de superficie junto con el tamaño y la complejidad de las células sugiere un aumento de una población que podía ser compatible con células mesenquimales (MSC) o endoteliales.

Tras analizar la expresión del marcador para células endoteliales CD31 en dos pacientes, no se detectó la presencia de dicho marcador, sugiriendo de manera

indirecta un aumento de células mesenquimales-*like* (MSC-*like*) definidas como CD13^{high}, CD45^{neg}, CD34^{neg/low}, CD117^{neg}, en 9 de los 23 pacientes, cinco SMD-LMA y cuatro SMD-EE. El porcentaje de nuestra población MSC-*like* en el momento del diagnóstico (MSC-*like* M1) y en el seguimiento/evolución de la enfermedad (MSC-*like* M2) se detallan en la Tabla 23.

Tabla 23. Cuantificación de las células mesenquimales-*like*. Se cuantificaron en la muestra inicial (M1) y en la muestra al seguimiento o transformación (M2).

	Paciente	MSC- <i>like</i> M1 (%)	MSC- <i>like</i> M2 (%)	M2-M1 (%)	Aumento MSC- <i>like</i>	Trat. AZA	Adq. Variantes
SMD-LMA	1	0,069	0,059	-0,010	-	-	+
	2	0,180	0,570	0,390	+	+	+
	3	0,180	0,210	0,030	+	+	+
	4	0,059	0,163	0,104	+	+	+
	5	0,140	0,120	-0,020	-	-	+
	6	0,190	0,029	-0,161	-	+	-
	7	0,027	0,100	0,730	+	+	+
	8	0,140	0,090	-0,050	-	+	+
	9	0,120	0,017	-0,103	-	-	-
	10	0,380	0,160	-0,220	-	+	-
	11	0,019	0,220	0,201	+	+	ND
	12	0,960	0,850	-0,110	-	+	-
SMD-EE	1	0,020	0,066	0,046	+	-	-
	2	0,380	0,070	-0,310	-	+	-
	3	0,030	0,100	0,070	+	-	-
	4	0,110	1,300	1,190	+	-	-
	5	0,070	0,010	-0,060	-	-	+
	6	0,030	0,013	-0,017	-	-	-
	7	0,947	0,690	-0,257	-	+	-
	8	0,270	0,260	-0,010	-	-	-
	9	0,001	0,589	0,588	+	+	-
	10	0,130	0,100	-0,030	-	+	-
	11	0,300	0,180	-0,120	-	+	-

MSC-*like*: células mesenquimales-*like*, Trat.: tratados, Adq.: adquisición, ND: no disponible.

Se muestra el incremento de MSC-*like* en los diagramas de la Figura 29.

Se analizó la asociación entre el aumento de células mesenquimales-*like* y los parámetros clínico-biológicos de los pacientes. No se observó asociación con el riesgo por subtipo según la OMS, cariotipo, número de variantes patogénicas detectadas por secuenciación masiva ni con la detección de la presencia de variantes en alguno de estos genes *RAS/IDH1/2/TP53* (Tabla 24).

Tabla 24. Asociación de los parámetros clínico-biológicos con el aumento de MSC-*like*.

Grupos comparados	n	Casos Aum. MSC- <i>like</i>	P
IPSS-R bajo riesgo vs IPSS-R alto riesgo	4 12	0 5	0,181
Subtipo bajo riesgo vs Subtipo alto riesgo	9 14	3 6	0,495
Cariotipo Normal vs Cariotipo Alterado	7 9	2 3	0,635
<3 alteraciones CG vs ≥3 alteraciones CG	14 2	5 0	0,458
<4 variantes vs ≥4 variantes	15 8	5 4	0,367
Familia <i>RAS/IDH1/2/TP53^{wt}</i> vs Familia <i>RAS/IDH1/2/TP53^{mut}</i>	8 14	3 5	0,642

Aum.: aumento, CG: citogenética, wt: *wild type*, mut: mutado, Aum.: aumento; MSC: células mesenquimales-*like*.

Sin embargo, se observó un aumento significativo de células mesenquimales-*like* (MSC-*like* +) en aquellos pacientes que adquirieron una mutación (MUT), fueron tratados con azacitidina (AZA) y se transformaron a LMA (p=0,039). La combinación de estas tres variables, i) adquisición de mutaciones, ii) tratamiento con AZA y iii) transformación a LMA, la denominamos triada SMD^{AZA/MUT/LMA}. No se detectó un aumento significativo de las MSC-*like* en aquellos pacientes que únicamente cumplían una o varias de las variables de manera individual o pareada (p>0,1). Además, se observó cómo todos los pacientes SMD^{AZA/MUT/LMA} pertenecían al subgrupo de alto riesgo por el IPSS-R, con una diferencia significativa en la asociación al aumento de MSC (p=0,031) (Tabla 25).

Tabla 25. Cohortes de pacientes con SMD comparados según si adquieren variantes patogénicas (MUT), si han sido tratados con azacitidina (AZA) y/o si han evolucionado a leucemia mieloide aguda (LMA), y su asociación con el aumento de las MSC-like.

Grupos comparados	n	Casos Aumento MSC-like	P
SMD ^{AZA/MUT/LMA}	5	4	0,039
SMD	17	1	
SMD ^{AZA/LMA}	10	5	0,306
SMD	13	4	
SMD ^{MUT/LMA}	7	4	0,182
SMD	15	4	
SMD ^{AZA}	14	6	0,495
SMD	9	3	
SMD ^{LMA}	12	5	0,567
SMD	11	4	
SMD ^{MUT}	9	4	0,416
SMD	13	4	
SMD ^{AZA/MUT/LMA} + IPSS-R Alto riesgo	3	3	0,031
SMD + IPSS-R Alto riesgo	17	4	

Mut: mutado, AZA: azacitidina; LMA: leucemia mieloide aguda; MSC-like: células mesenquimales-like.

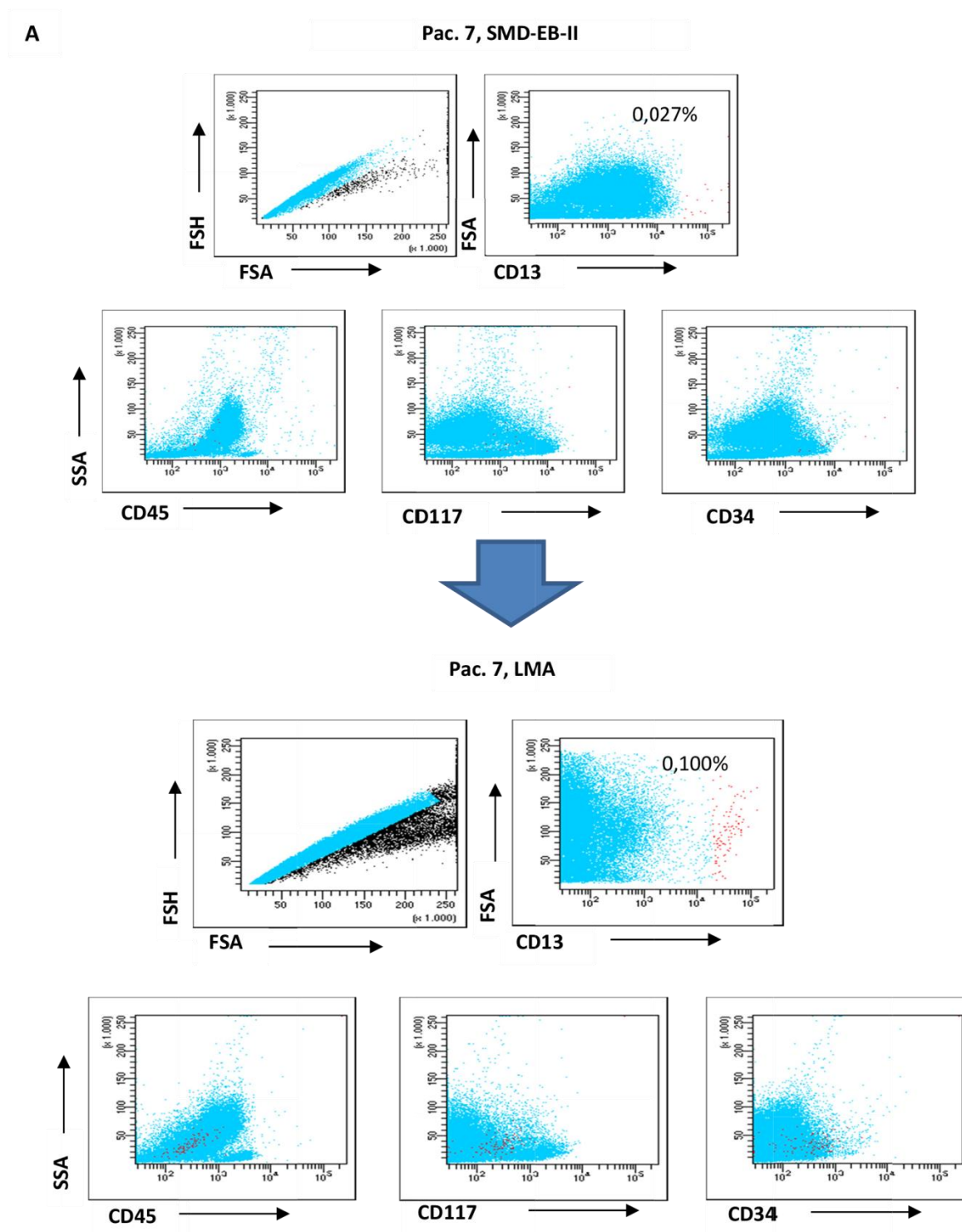


Figura 29. Cambios observados en la población $CD13^{high}$ al diagnóstico y seguimiento de 3 pacientes de la cohorte estudiada. A) Paciente con $SMD^{AZA/MUT/LMA}$ B) Paciente con $SMD^{AZA/LMA}$ C) Paciente con SMD^{AZA} .

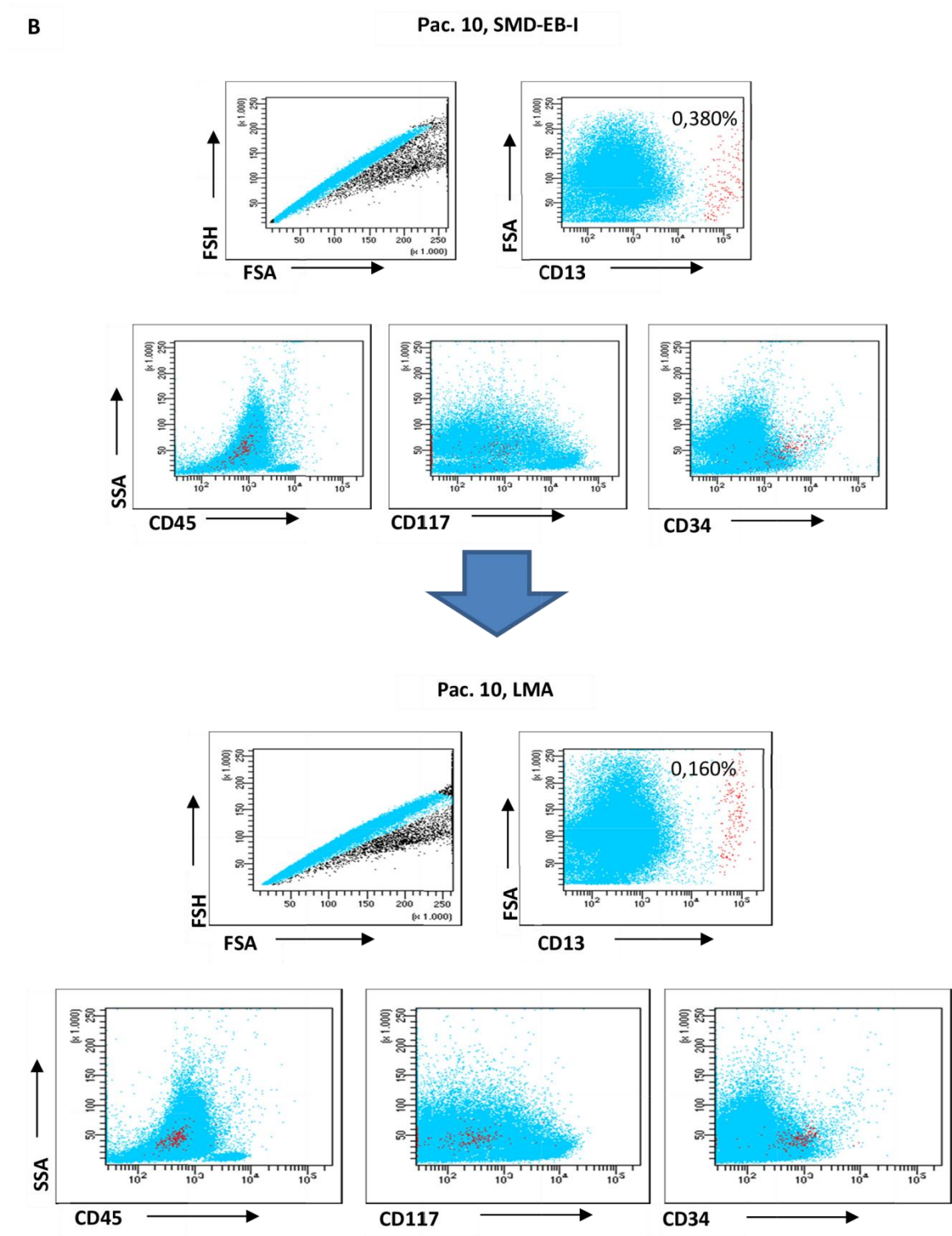


Figura 29. Continuación.

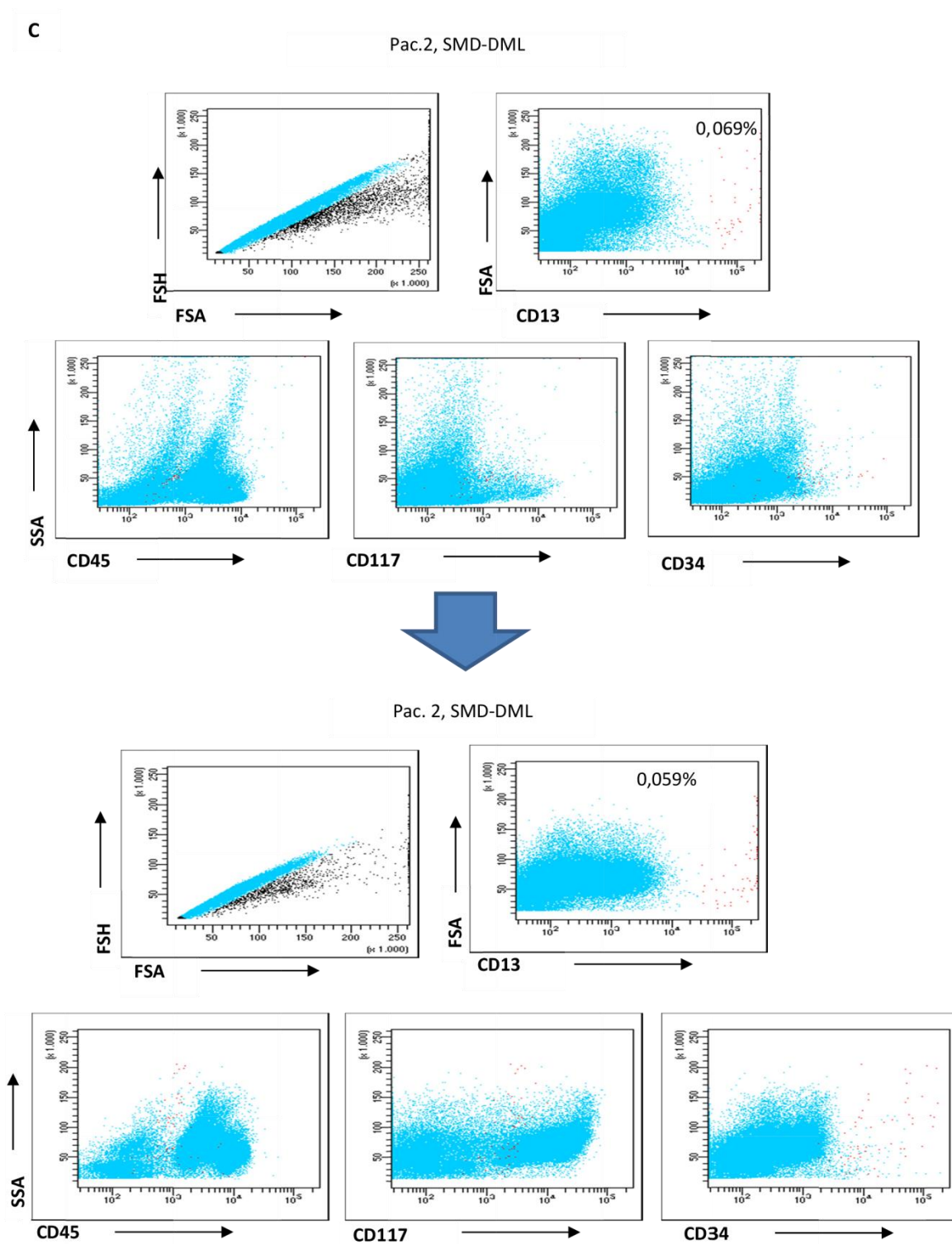


Figura 29. Continuación.

CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DE LOS SÍNDROMES MIELODISPLÁSICOS

Tabla 26. Resumen de las características biológicas de los pacientes con SMD-EE.

N	Sexo / Edad	Estado	T (m)	Subtipo OMS2017	Cariotipo	Tratamiento	Estado	Adq. Variante	Aum MSC-like	Transf. LMA	Exitus
1	M/52	Dx Seg	6	SMD-SA-DML SMD-SA-DML	Sin Metafasas Sin Metafasas	- Post-EPO	Enf. estable		Si	No	No
2	H/73	Dx Seg	5	SMD-DML SMD-DML	46,XY[20] 46,XY[20]	- Post-AZA	Enf. estable	-	No	No	Si (21)
3	H/62	Dx Seg	5	SMD-DML SMD-EB-I	46,XY[20] 46,XY[20]	- Post-EPO	Progresión	-	Si	No	Si (9)
4	M/73	Seg Seg	21 32	SMD-DML SMD-DML	Sin Metafasas Sin Metafasas	Post-EPO Pre-Aza	No respuesta No respuesta	-	Si	No	Si (35)
5	H/76	Dx Seg	5	SMD-DML SMD-DML	46,XY[20] 46,XY[20]	- Post-Epo	Enf. estable	NRAS (5%)	No	No	Si (5)
6	H/67	Seg Seg	13 19	SMD-DML SMD-DML	46,XY,ider(20)(q10),del(20)(q11q13)[9]/46,XY[1] 46,XY,ider(20)(q10),del(20)(q11q13)[13]/46,XY[7]	Sin Tratamiento Sin Tratamiento	Enf. estable Enf. estable	-	No	No	Ps
7	H/74	Dx Seg	10	SMD-EB-I SMD-EB-I	46,XY,t(1;17)(p35;q21),del(7)(q22q32),t(9;14)(q34;q11)[5]/46,XY[3] 46,XY,t(1;17)(p35;q21),del(7)(q22q32),t(9;14)(q34;q11)[1]/46,XY[9]	- Post-Aza	Enf. estable		No	No	Si (34)
8	H/81	Seg SEg	10 26	SMD-EB-I SMD-EB-I	46,XY,del(5)(q13q33)[9]/46,XY[7] 46,XY,del(5)(q13q33)[4]/46,XY[16]	Post-EPO Pre-Lena	No respuesta No respuesta	-	No	No	No
9	H/67	Dx Seg	6	SMD-EB-I SMD-EB-I	47,XY,+21[7]/46,XY[13] 47,XY,+21[11]/46,XY[9]	- Post-Aza	Enf estable Enf. estable	-	Si	No	No
10	H/47	Dx Seg	4	SMD-EB-II SMD-EB-I	46,XY,t(6;9)(p22;q34)[9]/46,XY[1] 46,XY,t(6;9)(p22;q34)[13]/46,XY[20]	- Post-Aza	No respuesta	-	No	No	Si (10)
11	H/77	Seg Seg	4 8	SMD-EB-II SMD-EB-II	46,XY[20] 46,XY[20]	Post-Aza Post-Aza	Enf. estable	-	No	No	Si (12)

M: mujer, H: hombre, Dx: diagnóstico, Seg.: seguimiento, Transf.: transformación a LMA, Enf.: enfermedad, Adq.: adquisición, Aum.: aumento, MSC-like: células mesenquimales-like.

Tabla 27. Resumen de las características biológicas de los pacientes con SMD-LMA.

N	Sexo Edad*	Estado	Tiempo (m)	Subtipo OMS2017 ¹	Cariotipo	Tratamiento	Estado	Adq. Variante	Aum MSC-like	Transf. LMA	Exitus Tiempo (m)
1	M/81	Dx Transf. LMA	16	SMD-DML LMA	46,XX[15] 46,XX,del(5)(q15q33)[16]/46,XX[7]	- Sin Tratamiento	- Progresión	- IDH1 (36%)	- No	- Si	- Si (21)
2†	M/78	Dx Seg Transf. LMA	9 16	SMD-EB-I SMD-EB-I LMA	47,XX,t(X;20)(q13;q13),+8[12] 47,XX,t(X;20)(q13;q13),+8[6]/46,XX[3] 47,XX,t(X;20)(q13;q13),+8[6]/46,XX[3]	- Sin Tratamiento Post-AZA	- Enf. estable Progresión	- IDH2 (20%), TP53 (4,8%) IDH1 (13% y 7%)	- Si	- Si	- Si (22)
3†	H/69	Seg Transf. LMA	15 26	SMD-EB-I LMA	47,XY,+8[8]/46,XY[4] 49,X,-Y,+8,+8,+21,+22[13]/46,XY[3]	Post- AZA Post- AZA	- Progresión	- NRAS (30%)	- Si	- Si	- Si (27)
4†	H/71	Dx Transf. LMA	9	SMD-EB-I LMA	46,XY[20] 46,XY[20]	- Post- AZA	- Progresión	- IDH1 (18%)	- Si	- Si	- Si (16)
5	M/58	Dx Transf. LMA	3	SMD-EB-I LMA	46,XY[20]// FISH del5q, -7 positivo 43=44,XX,t(1;9)(p32;p24),del(5)(q13;q33),+8,del(12)(q24),-17,-18,-21[cp17]	- Sin tratamiento	- Progresión	- NRAS (6,7%), KRAS (13,6%)	- No	- Si	- Si (6)
6	H/66	Seg Seg Seg Transf. LMA	9 16 29 39	SMD-DML SMD-DML SMD-EB-I LMA	46,XY,del(20)(q12)[16]/46,XY[2] 46,XY[20] 46,XY,del(20)(q12)[6]/46,XY[14] Sin Metafases	Sin Tratamiento Post- AZA Pre-TPH Post-TPH	- Enf. estable Enf. estable Progresión	- TET2 (5,3%) U2AF1* (20%)	- No	- Si	- Si (41)
7†	H/67	Dx. Seg. Transf. LMA	5 8	SMD-EB-II SMD-EB-II LMA	46,XY[5]//FISH 5q,7q negativo 46,XY[15] 46,XY,+8[15]/46,XY[5]	- Post- AZA Post- AZA	- No Respuesta No Respuesta	- STAG2 (3,2%) NRAS (25%)	- Si	- Si	- Si (22)
8	M/77	Dx Seg Transf. LMA	32 34	SMD-EB-II SMD-EB-II LMA	Sin metafases// FISH del5q, -7 positivo 46,XX,del(5)(q13q33)[16]/45,XX,del(5)(q13q33),-7[10] 45,XX,del(5)(q13q33),-7[12]/46,XX,del(5)(q13q33)[1]	- Sin Tratamiento Post- AZA	- Progresión Progresión	- KRAS (6,3%)	- No	- Si	- Si (36)
9	M/64	Seg Transf. LMA	46 55	SMD-DML LMA	46,XX[20] //Fish del(7q) 46,XX,del(7)(q21)[17]/46,XX[3]	Sin Tratamiento Pre-TPH	- Progresión	- -	- No	- Si	- No
10	H/61	Progresión Transf. LMA	17 21	SMD-EB-I LMA	46,XY[18] 46,XY[20]	Post- AZA Pre-Flagida	Progresión Progresión	- -	- No	- Si	- Si (33)
11	H/79	Dx Seg Transf. LMA	4 10	SMD-EB-2 SMD-EB-I LMA	Sin Metafases 46,XY[20] Sin Metafases	- Post- Aza Post- AZA	- Enf. estable Progresión	- - ND	- Si	- Si	- Si (17)
12	M/66	Dx Transf. LMA	11	SMD-EB-II LMA	46,XX,del(5)(q13q33),-7,-9,-10,- 12,der(17)t(7;17)(p10;q10),der(19)t(19;?)p(13.3),+4mar[10] 46,XX,del(5)(q13q33),-7,der(10)t(10;?)p(11;?),-12,der(17)t(7;17)[2]/46,XX[18]	- Post-AZA	- Progresión	- -	- No	- Si	- Si (13)

†: Tríada, M: mujer, H: hombre, Dx: diagnóstico, Seg.: seguimiento, Transf.: transformación a LMA, Enf.: enfermedad, Adq.: adquisición, Aum.: aumento, MSC-like: células mesenquimales-like.

DISCUSIÓN

1. PERFIL GENÉTICO DE LOS SINDROMES MIELODISPLÁSICOS

1.1 UTILIDAD DE LA TÉCNICA DE CARIOTIPO Y FISH EN EL PRONÓSTICO DE LOS SMD

Los SMD se caracterizan por una gran heterogeneidad morfológica, clínica y citogenética, presentando alrededor del 50% de los pacientes alteraciones en su cariotipo. En el trabajo de Haase y cols.³¹ en el que se analizaron 2072 SMD, un 52,1% de los pacientes tenían un cariotipo alterado (n=1080/2072), y los cromosomas 5 y 7 fueron los más frecuentemente implicados. En nuestro trabajo, se observó un 58,4% (n=45) de cariotipos alterados, siendo el cromosoma 5 (n=19; 42,2%), el 7 (n=13; 28,9%), el 8 y el 20 (n=9; 20% cada uno) y el cromosoma sexual Y (n=5; 11,1%) los más afectados. Estos datos son comparables con lo descrito en la literatura (Tabla 28).

Tabla 28. Alteraciones citogenéticas más frecuentes encontradas en la literatura.

Alteración citogenética	Solé y cols. ⁸⁴ N=327	Haase y cols. ³⁰ . N=1080	Atance y cols. N=45
del5q/-5	93 (28,4%)	381(35,2%)	19 (42,2%)
del7q/-7	69 (21,1%)	230(21,3%)	13 (28,9%)
+8	56 (17,1%)	173 (16%)	9 (20%)
del20q	21 (6,4%)	74 (6,8%)	9 (20%)
-Y	12 (3,7%)	58 (5,4%)	5 (11,1%)

En este trabajo, los resultados obtenidos fueron ligeramente superiores en frecuencia a los reportados^{30,84}, debido probablemente al tamaño muestral y a una cohorte enriquecida en pacientes con alteraciones en el cromosoma 20.

En la actualidad, el *score* IPSS-R es el que se emplea en la práctica habitual para establecer el pronóstico de los SMD²⁰. La información genética que se obtiene a partir del cariotipo es la variable de mayor puntuación y clasifica a los pacientes en cinco categorías. En esta serie de 106 pacientes, se pudo establecer el IPSS-R en aquellos de los que se dispuso información del cariotipo (n= 45), asociándose de manera significativa los pacientes con IPSS-R de alto riesgo a una menor SG y SLT a LMA.

Además, en el análisis multivariado el IPSS-R fue un factor pronóstico independiente. Sin embargo, el IPSS-R tiene limitaciones. Por un lado, es importante mencionar que en un 27,3% de los casos no se pudo calcular dicho *score*, por lo que no fue posible

estimar la supervivencia de estos pacientes. Por otro lado, 3 pacientes con un IPSS-R *a priori* de bajo riesgo, tuvieron un comportamiento clínico que no fue el esperado, como es el caso del paciente 74 con un IPSS-R bajo y con un cariotipo de buen pronóstico (46,XY,del(11)(q22q24)). Esta alteración se clasifica dentro del sistema de estratificación citogenética en el subgrupo de muy buen pronóstico con una SG de 60,8 meses y una SLT no evaluable. Sin embargo, este paciente evolucionó a LMA, por lo que la información aportada por el IPSS-R y el cariotipo no fueron suficientes para predecir la evolución fatal de su enfermedad.

La técnica de FISH, aunque no se contempla como información genética en el IPSS-R, puede ser de utilidad en aquellos pacientes en los que no se obtienen metafases o en el caso concreto de la sospecha morfológica de SMD-del5q con un cariotipo normal^{85,86}. Las guías europeas⁷⁶ recomiendan el análisis de los cromosomas 5, por la orientación terapéutica de la lenalidomida, y 7, por su asociación a un peor pronóstico de la enfermedad. En el presente estudio, la aplicación de la técnica de FISH permitió identificar la del(5)(q31) en 3 pacientes en los que no se dispuso de cariotipo y en un caso que presentó un cariotipo normal. En este último paciente la positividad por FISH no superó el 10% de los núcleos analizados. Con respecto al cromosoma 7, la aplicación de la técnica de FISH en los casos en los que no se obtuvieron metafases permitió identificar una del(7)(q31) y una monosomía 7 en dos. En un paciente con cariotipo normal se detectó la del(7)(q31) en menos del 10% de los núcleos que se analizaron. En resumen, la combinación de ambas técnicas permitió obtener información genética en el 41,9% de los pacientes analizados.

1.2 UTILIDAD DE LA TÉCNICA DE SECUENCIACIÓN MASIVA Y SIGNIFICADO PRONÓSTICO DEL PERFIL MOLECULAR

1.2.1 Comparación de plataformas

En el presente trabajo, se han empleado dos plataformas de secuenciación masiva, un panel comercial (SOPHIA GENETICS) y un panel customizado (ThermoFisher) que incluían 30 y 39 genes, respectivamente. Recientemente, Aguilera-Díaz y cols⁸⁷ han comparado el uso de cuatro plataformas de secuenciación masiva con diferente número de genes (rango, 23-48) y no evidenciaron diferencias significativas en la

detección de variantes con significado clínico (rango media: 1,1-1,5 variantes/paciente). En nuestro estudio empleamos dos plataformas y no observamos diferencias en la media de genes detectada por ambas (media_{ThermoFisher}= 2,10 vs media_{SOPHIA GENETICS}= 2,45; p=0,152). No obstante, la media de variantes detectadas fue superior, ya que a diferencia del trabajo de Aguilera-Díaz y cols., en el que sólo incluyeron las variantes patogénicas y probablemente patogénicas para establecer la diferencia de medias, en el nuestro se incluyeron también las variantes de significado incierto. Esto explicaría el aumento del número de variantes detectadas.

Sin embargo, hubo 17 variantes discordantes en los genes *BCOR*, *GNAS*, *NF1*, *PHF6*, *RAD21* y *STAG2* que no se incluían en el diseño del panel de SOPHIA GENETICS. Los genes *GNAS*, *NF1* y *RAD21*, cuya frecuencia descrita en la literatura es menor del 2%^{38,39}, se encontraron afectados en un 0,9% de los pacientes (n=1/106). Concretamente, la variante *GNAS*^{R844H} se detectó, sin otras mutaciones acompañantes, en un caso de SMD-Del5q que no precisó tratamiento. Esta variante posiblemente patogénica fue descrita en otros tejidos como somática pero no ha sido reportada en patología mieloide. En un paciente con un SMD-DML, se detectó también la variante posiblemente patogénica *NF1*^{D176E}, no descrita en patología mieloide. La variante *RAD21*^{Y3*} se observó junto a otros 4 genes más, en un paciente con un SMD-EB-I que progresó a LMA, tras una evolución citogenética y la adquisición de una variante patogénica en *NRAS*.

Los factores de la transcripción *BCOR* y *PHF6*, resultaron alterados en 5 (4,7%) y 3 (2,8%) pacientes, respectivamente, con frecuencias similares a las descritas en la literatura (<5%)^{38,39}. Los pacientes con *PHF6* afecto, todos ellos de tipo SMD-DML, no evolucionaron a LMA, mientras sí lo hicieron dos de los cinco pacientes con presencia de variantes en *BCOR*, un SMD-EB-I y un SMD-DML con cariotipo complejo, evolucionaron a LMA. Finalmente, se han descrito variantes que afectan al gen *STAG2* en un 5-10% de los pacientes y que se han asociado a un peor pronóstico de la enfermedad^{38,39}. En nuestra serie se han detectado 6 variantes patogénicas en dos pacientes con SMD-EB-I y cuatro con SMD-DML, tres de ellos con del(20q). En todos los casos se encontraron más de 3 variantes patogénicas y en dos de los 6 pacientes con *STAG2* alterado (un SMD-DDML y un SMD-EB-I) se observó evolución a LMA.

Estos hallazgos sugieren que los genes *STAG2* y *BCOR* deberían estar incluidos en los paneles de NGS orientados al estudio de los SMD por su frecuencia (5-10% y 2-5%) y su implicación en pacientes con subtipos de alto riesgo y progresión a LMA^{88,89}.

1.2.2 Perfil molecular de los SMD

Los estudios de secuenciación masiva en SMD permiten aumentar el número de pacientes de los que podemos conocer su perfil genético. Las frecuencias de detección de variantes patogénicas en las series de pacientes con SMD publicadas en el año 2013, fueron del 89,5%³⁹ y del 74%³⁸. En nuestra cohorte de 106 pacientes, un 86,8% presentaron al menos una variante y se detectaron un total de 236 variantes patogénicas.

En cuanto al número de mutaciones, Haferlach y cols.³⁹ encontraron una mediana de 3 variantes por paciente (rango, 0-12) mientras que en nuestro trabajo observamos 2 variantes por caso (rango, 0-7). Aguilera-Díaz y cols.⁸⁷ detectaron una media de 1,2 utilizando el panel de SOPHIA GENETICS. Esta diferencia en el número de variantes detectadas puede ser debida a varias causas: (i) la diferencia en el número de casos analizados; (ii) el número de genes incluidos en los paneles; y (iii) las VAF a partir de las cuales se han considerado las variantes (Tabla 29).

Tabla 29. Parámetros que influyen en la mediana de variantes patogénicas detectadas.

	Haferlach y cols. ³⁹	Atance y cols.	Aguilera-Díaz y cols. ⁸⁹
Mediana	3	2	1,2
Nº Pacientes	944	106	15
Nº Genes	104	30-39	30
VAF (%)	>0,5%	>2%	≥5%

Nº: número; VAF: *variant allele fraction*.

Además, los pacientes que evolucionaron a LMA (19/106), presentaron una media de mutaciones superior a los que tenían un SMD con enfermedad estable (3 vs 2,1; $p=0,017$), confirmando el hecho reportado de que el número de variantes sí es un parámetro de impacto en la transformación leucémica^{23,38,39}.

Los genes más frecuentemente alterados en nuestro trabajo coinciden con los más recurrentemente afectados en las grandes series^{23,38,39}, detectándose en más de un 15% variantes patogénicas en: *SF3B1* (29,2%), *TET2* (26,4%), *ASXL1* (20,7%), *DNMT3A* (18,9%), *SRSF2* (17,9%) y *RUNX1* (16%). Las frecuencias en los genes *DNMT3A*, *SRSF2* y

RUNX1 fueron ligeramente superiores a las descritas, pudiendo relacionarse con la inclusión, en nuestra serie, de pacientes con enfermedad estable (20,7%) y no sólo en el momento del diagnóstico, en los que se puede esperar una mayor frecuencia de alteraciones en estos genes que se adquieren en etapas posteriores.

Las mutaciones en la vía del *splicing* y en la vía de la metilación del ADN tienen un papel destacado al determinar las características clínicas de la enfermedad así como el riesgo de transformación a LMA, debido a que no sólo ocurren en etapas tempranas sino que también influyen en la evolución genómica por los diferentes patrones de asociaciones de coexistencia y exclusividad génicas³⁸. Tanto en nuestro estudio como en el trabajo de Haferlach y cols.³⁹ (58,5% y 43,4% vs 62% y 48%) las vías del *splicing* y de la metilación del ADN fueron las más representadas.

Las variantes detectadas en los genes del *spliceosoma* (*SF3B1*, *SRSF2*, *U2AF1*) suelen ser excluyentes^{39,44,90}, lo que sugiere un efecto redundante en la patogénesis de la enfermedad. En este trabajo, se confirmó esta exclusividad en los genes del *spliceosoma*, excepto en un paciente en el que se observó la afectación simultánea de los genes *SF3B1* y *SRSF2*. Este hallazgo, aunque es poco frecuente, se ha reportado previamente⁹¹ sin poder demostrar la posible coexistencia en estos casos de dos clones implicados en el desarrollo de un SMD. Con respecto a los genes *SRSF2* y *U2AF1*, no detectamos ninguna de las variantes patogénicas simultáneamente, aunque la diferencia no fue significativa. Es destacable la exclusividad entre el gen *TET2* y los genes de mal pronóstico *U2AF1* y *TP53* ($p=0,035$ y $p=0,033$, respectivamente) sugiriendo un posible efecto protector de las variantes patogénicas en *TET2*. La relación entre este gen y el *TP53* se ha descrito en la literatura³⁸, mientras que la exclusividad entre *TET2* y *U2AF1* y entre *TP53* y *SF3B1* ($p=0,017$) no están reportadas^{38,39}. Con respecto a los patrones de asociación, se confirmaron las asociaciones significativas de *SRSF2* con *ASXL1*, *RUNX1*, *IDH2*, *TET2* y negativa con *DNMT3A*, todas ellas descritas en la literatura^{38,39,59}.

En relación con el análisis del perfil mutacional de cada subtipo, los SMD-SA presentaron el espectro más característico y homogéneo observándose en un 85% de ellos variantes patogénicas en los genes de las vías del *spliceosoma*⁴⁴. En la última

clasificación de la OMS¹, el gen *SF3B1* se incluyó como biomarcador con capacidad diagnóstica de SMD-SA en aquellos pacientes con un recuento de sideroblastos en anillo mayor del 5%. En nuestra serie se observaron alteraciones del gen *SF3B1* en el 100% de los SMD-SA-DUL y en el 70,6% de SMD-SA-DML (12/17), siendo la variante más frecuente la *SF3B1*^{K700E}. Un 23,5% de los SMD-SA-DML (4/17) no presentaron alteraciones en los genes relacionados con el *splicing* y un 3,7% presentó variantes en *U2AF1* (1/17). En 12 pacientes se observaron variantes acompañantes que afectaban principalmente a *TET2* (n=9) y a *DNMT3A* (n=6), y menos frecuentemente en *ASXL1* (n=1) y *RUNX1* (n=1), genes que también se reportan en la literatura^{38,39,92,93}.

Con respecto a los SMD-del5q, la característica principal de su espectro mutacional es el bajo número de variantes patogénicas detectadas, presentando la mayoría de ellos una o ninguna⁷³. Además, el perfil mutacional de los SMD-del5q no se caracteriza por la presencia de una variante característica y es importante mencionar que un 18% de los pacientes pueden presentar alteraciones del gen *TP53*, aunque son más frecuentes en los pacientes con otras alteraciones citogenéticas adicionales a la del(5q)^{33,36,73,94}. La detección de esta alteración se recomienda en todos los pacientes con SMD-Del5q ya que el presentar una alteración de *TP53* adicional, se asocia a una falta de respuesta al tratamiento con lenalidomida^{95,96}. En nuestro estudio, se ha observado una media de una variante patogénica por paciente lo que coincide con los datos publicados. Con respecto al gen *TP53*, se estudiaron los exones del 4 al 9 en el momento del diagnóstico mediante secuenciación *Sanger*, y el gen completo mediante NGS. No se detectaron variantes patogénicas en ninguno de los pacientes, probablemente porque sólo tenían la del(5q) como única alteración cromosómica.

Los pacientes con SMD-DUL presentan un bajo número de variantes por paciente^{38,39}. Sin embargo, en nuestra serie se detectó una media de 2,8, similar a pacientes con un SMD de alto riesgo. Revisando detalladamente los factores de riesgo de estos pacientes, cuatro de seis presentaron un IPSS-R de bajo riesgo, ninguno evolucionó a LMA y siguen vivos al final del estudio (mediana de seguimiento de 30,5 meses). Tras el análisis del tipo de variantes detectadas, se observó cómo tres pacientes presentaron dobles y triples mutaciones; un paciente presentó tres variantes en *RUNX1*, otro

presentó tres en *TET2* y otro presentó una variante doble en *ASXL1*, lo que podría sugerir un efecto redundante en la patogénesis de la enfermedad.

Finalmente, los SMD-EB son los subtipos que más variantes por paciente muestran presentando alteraciones no solo en los genes implicados en las vías del *splicing* y metilación del ADN, sino también en los factores de la transcripción, en genes de la familia RAS, en los complejos remodeladores de la cromatina y en la familia de las cohesinas^{23,38,39}. En nuestra serie, las mayores medias de variantes correspondieron a los SMD-EB I y II (2,5 y 2,9, respectivamente), tal como se describe en la literatura^{38,39}.

1.2.3 Valor pronóstico del perfil genético: hacia un IPSS-R molecular

Actualmente, el IPSS-R es el *score* que se emplea en la práctica clínica para establecer el pronóstico de los SMD y estratifica a los pacientes en cinco grupos de riesgo cuya supervivencia varía desde los 121 meses en los SMD de muy bajo riesgo a los 9 meses en los de muy alto riesgo²⁰. Sin embargo, se estima que en un 20-30% de casos no es posible el cálculo de este *score* por no disponer de la información del cariotipo. Con la descripción de los perfiles moleculares, se han podido establecer en distintas series de pacientes la asociación de variantes genéticas con la SG y la SLT a LMA.

El número de variantes detectadas en los SMD se ha asociado en las distintas series reportadas con una menor SG y SLT^{23,38,39}. En el trabajo de Papaemmanuil y cols. la presencia de un mayor número de mutaciones (rango, 1-6) se asoció con un peor pronóstico de los pacientes, de manera más significativa en el subgrupo de 4-5 variantes y en el de más de 6 variantes *drivers*. El grupo de Bejar y cols.⁹⁷ también demostró en su serie que el subgrupo de más de 3 variantes patogénicas presentó la menor supervivencia de la cohorte. En nuestra serie no se han podido confirmar estos resultados debido al menor número de pacientes estudiados y al menor número de genes analizados. Sin embargo, hemos podido establecer que la detección de ≥ 4 variantes patogénicas, empleando los paneles de 30 y 39 genes, se asoció con una menor SG y SLT en el análisis univariado, siendo una de las variables que describimos como factor pronóstico independiente.

Las variantes en los genes *TET2* y *SF3B1* se han asociado a una mejor supervivencia de los SMD, sugiriendo un efecto “protector”^{42,98-100}. En nuestro trabajo también se

observó este impacto favorable en la supervivencia global en aquellos pacientes con alteraciones en *SF3B1*. El único paciente con una doble alteración en este gen (SMD-DML e IPSS-R intermedio) seguía vivo en la última revisión de su estatus (39 meses desde el momento del diagnóstico). Además, este gen se asoció con los subtipos de la OMS e IPSS-R de bajo riesgo, mientras que no se observó en pacientes con cariotipos complejos. Con respecto a la presencia de alteraciones acompañantes a *SF3B1*, se ha reportado que la presencia adicional de variantes en *ASXL1*, se asociaba a una peor supervivencia cuando se comparaba con el grupo de SMD con *SF3B1* como única alteración⁹³. En nuestro trabajo se compararon los SMD^{*SF3B1mut*} con los SMD^{*SF3B1mut/otra*}. A pesar de que la supervivencia a los 24 meses de los SMD^{*SF3B1mut/otra*} fue del 60,3% y que la de los SMD^{*SF3B1mut*} fue del 100%, no se observaron diferencias significativas entre ambos grupos ($p=0,121$). En relación a las variantes simultáneas en los genes *SF3B1* y *ASXL1*, se observó una menor SG ($p=0,003$). De igual forma, *TET2* es uno de los genes más alterados en todos los subtipos de SMD, sin embargo, su impacto en la supervivencia no está claro. Mientras que el estudio del grupo alemán en el que se incluyeron 355 pacientes con SMD no determinó un impacto en la supervivencia global⁹⁸, el grupo francés de SMD en un trabajo con 96 pacientes, sí observó que el gen *TET2* tenía, de manera independiente, un impacto favorable en la supervivencia⁹⁹. En nuestro estudio, observamos que la presencia de variantes en este gen se asociaba con una SG mayor, si bien no se demostró el mismo resultado en la SLT. Además, la presencia de mutaciones en *TET2* se asoció con un IPSS-R de bajo riesgo y con una tendencia a presentar un cariotipo normal, hallazgos que pueden apoyar el pronóstico favorable de este gen.

Con respecto a los genes que se han relacionado con una peor supervivencia de los pacientes, se ha reportado que *RUNX1* y *ASXL1* tienen un impacto desfavorable en la SG y en la SLT^{23,38,39}. Ambos genes presentaron una menor SG y SLT estadísticamente significativa en el análisis univariado ($p=0,019$ y $p=0,034$, respectivamente). Además, la presencia de variantes en *TP53*, *RUNX1*, *ASXL1*, *EZH2* y *ETV6* se ha asociado a una peor supervivencia en SMD de bajo riesgo, identificando a un subgrupo de pacientes con peor pronóstico del esperado¹⁰¹. La presencia de variantes patogénicas en alguno de los tres genes se asoció a una SG y SLT disminuida ($<0,001$ en ambas).

En el último metaanálisis de pacientes con SMD y *U2AF1* alterado, este gen se asoció a una SG y SLT desfavorable, y además, se relacionó con los subtipos de bajo riesgo^{102,103}. El estudio de este gen puede ser de vital importancia para la detección de un subgrupo de pacientes con una estimación de la supervivencia inferior a la esperada. En nuestra serie, se detectaron 11 pacientes con variantes en *U2AF1*, de los que únicamente dos fueron subtipos de la OMS de alto riesgo (SMD-EB-I). Dos de 11 pacientes con esta variante génica continúan vivos al final del seguimiento y dos pacientes con SMD-DML y datos de buen pronóstico evolucionaron a LMA. Uno de ellos presentó un cariotipo no informativo y posteriormente se detectó una del(5q) en el momento de la transformación a LMA, y el otro paciente tenía al diagnóstico una del(20q), que presentó también en la recaída tras un TPH. Los pacientes con variantes patogénicas en *U2AF1* presentaron una menor SG en nuestra serie, y fue uno de los factores pronósticos independientes detectados en nuestra cohorte.

Finalmente, la presencia de variantes en el gen *TP53* es un factor mal pronóstico en los SMD tanto en los de bajo riesgo como en aquellos que presentan cariotipos complejos^{33,73,94,104,105}. En nuestra serie de 106 pacientes, 12 presentaron alteraciones en este gen que se asociaron a una peor SG y SLT en el análisis univariado. En el análisis multivariado el gen *TP53* se estableció como factor pronóstico independiente. Además, la presencia de estas variantes se asoció con la presencia de anemia en el momento del diagnóstico, con cariotipos complejos y con un IPSS-R de alto riesgo. Recientemente, Bernad y cols.¹⁰⁶ han descrito tres subgrupos de pacientes con SMD y alteraciones en el gen *TP53*, SMD *TP53*^{wt} (estado nativo), *TP53*^{monoalélico} (mutación o delección) y *TP53*^{multi-hits} (mutación y delección). Este grupo observó una asociación significativa del cariotipo complejo, los subtipos de alto riesgo y una peor SG y SLT con los SMD *TP53*^{multi-hits}. En cambio, no encontraron diferencias entre los pacientes con *TP53*^{wt} y los de *TP53*^{monoalélico}. En nuestra serie, ninguno de los pacientes con *TP53*^{monoalélico} evolucionó a una LMA, mientras que todos los *TP53*^{multi-hits} se transformaron a LMA. Por lo tanto, aunque los pacientes con *TP53* alterado presentan una peor supervivencia global, aquellos en los que se observe más de un evento que altere este gen presentaran una evolución mucho peor.

2. MECANISMOS DE EVOLUCIÓN CLONAL DE LOS SMD

2.1 ADQUISICIÓN DE ALTERACIONES CITOGENÉTICAS

La evolución clonal citogenética, que tiene lugar entre el 11-39% de los casos de SMD¹⁰⁷, principalmente en los subgrupos de alto riesgo, está asociada a una peor supervivencia y a un mayor riesgo de transformación a LMA¹⁰⁸⁻¹¹¹. Los estudios citogenéticos son una herramienta diagnóstica y pronóstica en los SMD, siendo una de las pruebas obligatorias establecidas por la OMS en el estudio de SMD. Sin embargo, durante el seguimiento de la enfermedad el estudio del cariotipo no está establecido de manera rutinaria y se realizará bajo criterio del clínico responsable del paciente.

En nuestro segundo trabajo, se analizó la evolución clonal citogenética de los 23 pacientes incluidos en el estudio. Solo se observó la adquisición de alteraciones citogenéticas en un paciente que presentaba en el momento del diagnóstico una trisomía 8 (47,XY,+8[8]/46,XY[4], riesgo citogenético intermedio), y que evolucionó a un cariotipo complejo (49,X,-Y,+8,+8,+21,+22[13]/46,XY[3], riesgo citogenético muy alto) con 5 alteraciones numéricas. El paciente había recibido tratamiento con AZA, lo que podría haber favorecido la expansión del clon patológico^{108,109}. Finalmente, el paciente evolucionó a una LMA. Del resto de pacientes, en dos de ellos no se pudo confirmar la evolución citogenética. Los demás pacientes de la serie siguieron un patrón de estabilidad citogenética, incluyendo a los que se beneficiaron de tratamiento.

2.2 ADQUISICIÓN DE VARIANTES PATOGENÉTICAS

Las técnicas de NGS han permitido describir el fenómeno de evolución clonal en los SMD y en las LMA *de novo* que recaen después del tratamiento^{38,112}. Mediante el análisis de las frecuencias alélicas obtenidas en el estudio de muestras pareadas, se observó cómo hay genes cuyas variantes patogénicas se adquieren en una etapa más temprana (genes de la vía de *splicing* y de la metilación del ADN) y otros que se adquieren en etapas más tardías de la enfermedad (genes remodeladores de la cromatina, factores de transcripción...) o en la progresión a LMA (genes de señalización: vía RAS)^{38,39,90}. Analizamos la evolución clonal de 23 pacientes, 12 que

evolucionaron a una LMA (SMD-LMA) y 11 que no mostraron evolución de la enfermedad (SMD-EE). En 9 de los 23 pacientes se observó evolución clonal molecular, 8 tenían un SMD-LMA y uno un SMD-EE.

Con respecto a los genes alterados, Makishima y cols.¹¹³ compararon los perfiles moleculares de pacientes con SMD y de pacientes con LMA secundarias a SMD (SMD-LMA) y observaron una mayor frecuencia de alteraciones en los genes *FLT3*, *NPM1*, *NRAS*, *PTPN11*, *WT1* e *IDH1/2* en el perfil de los SMD-LMA (variantes Tipo I). Sin embargo, los genes *GATA2*, *STAG2*, *RUNX1*, *ASXL1* y *TP53* fueron más frecuentes en los subtipos de SMD de alto riesgo (variantes de Tipo II). En la cohorte de SMD-LMA, se detectó un 41,7% (5/12) de variantes Tipo I y un 66,7% (8/12) de variantes Tipo II. En cambio, en los SMD-EE únicamente se detectó un 18% de Tipo I y un 81,8% de Tipo II. En nuestra serie de 23 pacientes, se observaron los genes adquiridos *NRAS*, *IDH1*, *KRAS*, *IDH2*, *TP53* y *STAG2*, en 8 de los 9 pacientes que presentaron evolución clonal, confirmando la evolución a LMA en 7 de ellos. Con respecto al único paciente de SMD-EE en el que se observó una evolución clonal molecular, se detectó la variante patogénica *NRAS*^{G12A} con una VAF del 5%. La presencia de esta variante *NRAS* sugiere que la enfermedad podría estar evolucionando, si bien no se pudo confirmar por el fallecimiento del paciente a causa de una patología respiratoria.

Por lo tanto, la presencia de variantes de Tipo I es frecuente en los pacientes que presentan una evolución a LMA por lo que la realización de la técnica de NGS podría ayudar a monitorizar la agudización de la enfermedad.

2.3 TIPOS DE EVOLUCIÓN CLONAL

Los estudios del perfil molecular de los SMD han sugerido la evolución clonal lineal mediante la adquisición de variantes patogénicas como mecanismo principal de la evolución de la enfermedad¹¹². Mossner y cols.¹¹⁴ confirmaron en su trabajo la existencia de la evolución clonal lineal, definida como la adquisición sucesiva de variantes a partir de un clon ancestral, junto con la evolución clonal ramificada, definida como la emergencia de diferentes subclones a partir de este clon ancestral, que coexisten y comparten algunas de las variantes. La aparición de subclones puede producirse durante la progresión y a consecuencia de un tratamiento que acaba

seleccionando los clones más resistentes¹¹⁴. Cuatro pacientes de los 23 analizados en nuestro estudio presentaron evolución clonal lineal. Dos pacientes no habían recibido tratamiento (pacientes SMD-LMA 1 y 5) mientras que los otros dos pacientes (pacientes SMD-LMA 4 y 7) habían recibido AZA. En estos cuatro pacientes se adquirieron variantes patogénicas en genes de Tipo I y se documentó la transformación leucémica, verificando que se puede dar este proceso independientemente del tratamiento. Sin embargo, en los pacientes 9, 10 y 12 con un SMD-LMA, se observó estabilidad genética o expansión del clon patogénico.

Platt y cols.¹¹⁵ describieron una serie de 92 pacientes de LMA, SMD y LMMC con *IDH* alterado. Cuatro de 21 pacientes (19%) presentaron la coexistencia de una variante patogénica en *IDH1* y también en *IDH2*. Tras el análisis de las VAF, los autores concluyeron que un clon era el predominante (clon ancestral) y el otro no se encontraba en el clon fundador (subclon). Este mismo fenómeno de evolución clonal ramificada fue observado en el paciente 2 (SMD-LMA tratado con AZA) de nuestra serie. En un primer estadio se detectaron las variantes patogénicas de *IDH2*^{R140Q} (VAF: 21%) y *TP53*^{L257V} (VAF: 5%). En la evolución de la enfermedad, desapareció la variante de *TP53* probablemente debido al efecto de la AZA pero se potenció la aparición de otros dos subclones con variantes en *IDH1*^{R132C/R132H} (VAF: 13% y 7%). La diferencias de las VAF detectadas en *IDH1* (7-13%) e *IDH2* (20%) y el hecho que las variantes de *IDH1/2* se hayan descrito como excluyentes en la literatura¹¹⁶, sugiere la aparición de un clon independiente al inicial. Finalmente el paciente de nuestra serie evolucionó a LMA.

Un modelo de evolución clonal menos frecuente es el tipo *sweeping*⁷¹, que consiste en el reemplazo de un clon por otro. En el trabajo de Makishima y cols.¹¹³ se observó en 10 de los 44 pacientes (23%) de SMD que evolucionaron a LMA. En nuestra serie, este tipo de evolución clonal se detectó en el paciente SMD-LMA 8, que pertenecía al subtipo SMD-EB-II. En este caso no se dispuso de un cariotipo informativo al diagnóstico, aunque se detectó la del(5q) y la monosomía 7 por FISH. Presentó un primer clon con *SF3B1*^{K700E} y 32 meses después del análisis de la primera muestra se observó la desaparición de la variante en *SF3B1* y la aparición de un nuevo clon que presentaba la variante *KRAS*^{G12D}. Este paciente evolucionó a una LMA y el tratamiento

con AZA fue incapaz de frenar la enfermedad. En este caso el cariotipo complejo también fue detectado en la leucemización, sugiriendo que la variante de *KRAS* se adquirió en el clon genéticamente inestable.

Cabe destacar la arquitectura clonal observada en el paciente 6, que presentó al diagnóstico un cariotipo con una del(20q) y las variantes patogénicas en *U2AF1*^{S34F}, *STAG2*^{R614*} y *RUNX1*^{R162G}. Después del tratamiento con AZA, desaparecieron todas las variantes aunque en el estudio previo al TPH, se volvió a detectar únicamente el clon con *U2AF1*^{S34F}. Ocho meses después del TPH, este mismo clon ancestro reapareció y fue el causante de la recaída leucémica. Las variantes en *U2AF1* se asocian a la del(20q)^{117,118}, a los SMD de bajo riesgo y a un mal pronóstico¹¹⁹, a pesar del buen pronóstico de la alteración citogenética²⁹.

2.4 RELACIÓN FENOTIPO-GENOTIPO Y PAPEL DE LAS CÉLULAS MESENQUIMALES

Las características fenotípicas se han asociado a variantes genéticas en las neoplasias hematológicas. Concretamente, Martínez-Losada y cols.¹²⁰, observaron una asociación entre el cambio del perfil fenotípico y la evolución clonal en la recaída, en una serie de LMA con *NPM1* mutado al diagnóstico.

En nuestro trabajo no hemos observado asociaciones entre el patrón de expresión de los marcadores de maduración y de granulación, y las características genéticas de los pacientes. Por otra parte, con la estrategia de *gating* empleada se pudo detectar la presencia de una población de células muy brillante para el marcador CD13, presente en células mesenquimales derivadas de médula ósea¹³. Además, al ser negativa para la expresión de CD45 (leucocitos) y de CD31 (endotelio vascular), sugiere que podrían corresponder a células mesenquimales (*MSC-like*). Este tipo celular forma parte del nicho hematopoyético, de forma que tiene un papel fundamental para el correcto funcionamiento de la hematopoyesis normal, ya que regulan, mediante cascadas de señalización, la proliferación y diferenciación de las células hematopoyéticas^{8,15}.

En los 23 pacientes estudiados en esta serie, se detectó la presencia de esta población CD13^{high}, CD45^{neg} y CD34^{neg/low} en el momento del diagnóstico y en el seguimiento y/o evolución de la enfermedad. Observamos un aumento de *MSC-like* en un total de 9

pacientes. Cuatro se caracterizaban por haber sido tratados previamente con AZA, por la adquisición de una variante patogénica y por su evolución a una LMA.

El aumento de las *MSC-like* en los casos de SMD^{AZA/MUT/LMA} sugiere que la combinación de estos tres elementos juega un papel importante, que se resumen a continuación:

(1) La AZA, como tratamiento estándar en los SMD de alto riesgo, es un agente hipometilante que actúa sobre las células hematopoyéticas tumorales activando genes supresores de tumores. Además, nuestros resultados sugieren que la AZA tiene también un efecto sobre las *MSC-like* que forman el nicho hematopoyético. Favorece la proliferación de las *MSC-like*, potenciando así la hematopoyesis normal a partir de la regulación de las vías de interacción con el ECM-receptor (del inglés, *extracellular matrix receptor*), de la vía de CAM (del inglés, *cell adhesion molecules*) y de la vía de la adhesión focal de las MSC. Estas vías están relacionadas con el crecimiento, diferenciación, migración y comunicación intercelular, demostrando un efecto inmunoregulator (anti-inflamatorio) de la AZA en estas células del estroma¹²¹. Sin embargo, la AZA no parece ser el único responsable del aumento de las *MSC-like*, ya que no se observa este incremento en todos los pacientes que fueron tratados con este fármaco (aumento de *MSC-like* en 6 pacientes de los 14 tratados con AZA).

(2) Por otra parte, el aumento de las *MSC-like* se observó en aquellos pacientes que evolucionaron a LMA y fueron tratados con AZA. Durante el desarrollo de la LMA se produce una destrucción del nicho hematopoyético¹²², lo que explicaría la detección de un aumento del número de *MSC-like* que se detectan mediante CMF en las muestras procedentes del AMO. En nuestra serie, 5 pacientes que evolucionaron a LMA presentaron un aumento del número de *MSC-like*.

(3) Finalmente, los pacientes con un aumento en las *MSC-like* de nuestra serie también adquirieron nuevas variantes patogénicas. Este hallazgo puede estar relacionado con el hecho de que, al aumentar la complejidad genética del clon maligno, el tratamiento con AZA no es suficiente para frenar la enfermedad, tanto a nivel de las células hematopoyéticas como de las *MSC-like* (Figura 30).

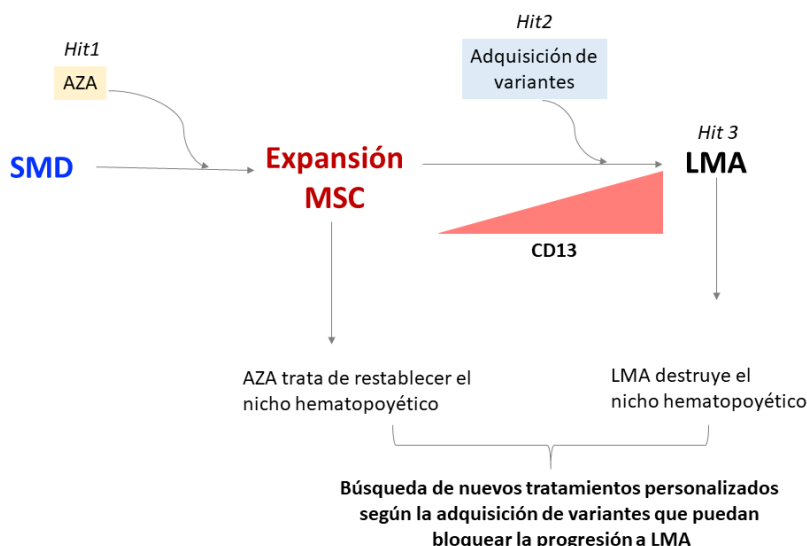


Figura 30. Esquema propuesto que muestra las relaciones entre la AZA, el microambiente y la evolución a LMA de los SMD.

Los resultados mostrados en nuestro trabajo sugieren que el tratamiento con agentes hipometilantes no es suficiente para frenar la enfermedad en pacientes con alto riesgo de transformación a LMA. Sería necesario combinarlo con otros fármacos, que actuaran de forma selectiva contra las dianas detectadas mediante secuenciación masiva. Podría ser interesante la inclusión de estos pacientes en ensayos clínicos con fármacos específicos como el inhibidor de *IDH1* (Ivosidenib, AG-120)¹²³ e *IDH2* (Enasidenib, AG-221)¹²⁴ o con fármacos inhibidores de la vía MEKK o PI3K/AKT para las variantes en genes de la familia RAS (Rigosertib)¹²⁵⁻¹²⁷.

Este es un campo en el que es necesario realizar estudios más amplios, con un número mayor de pacientes y con disponibilidad de muestras al diagnóstico y en el desarrollo de la enfermedad. De esta forma se podría evaluar la dinámica de las MSC y monitorizar la expresión de $CD13^{high}$ en las muestras de MO, con la finalidad de adelantarnos al diagnóstico de LMA.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. El empleo adicional de las técnicas de secuenciación masiva en pacientes con SMD permitió caracterizar el 92,5% de los casos, mientras que el estudio citogenético lo hizo en el 49,1%. Esto demuestra la utilidad de la combinación de ambas técnicas.
2. Las variantes en los genes *SF3B1* y *TET2* se asociaron a pacientes con subtipos de bajo riesgo, mientras que las de *SRSF2*, *RUNX1* y *TP53* se relacionaron con los de alto riesgo. Además, el gen *TP53* se asoció con anemia al diagnóstico y la presencia de cariotipo complejo, y el gen *SRSF2* con trombocitopenia.
3. La detección de un número de variantes mayor o igual a cuatro y las alteraciones de los genes *ASXL1*, *RUNX1*, *U2AF1* y *TP53* se asociaron a una peor supervivencia global y libre de transformación a LMA, a excepción del gen *U2AF1* que sólo se asoció a una menor supervivencia global. La combinación del IPSS-R, del número de variantes mayor o igual a cuatro, y de las variantes patogénicas en *U2AF1* y *TP53*, fueron factores pronósticos independientes. Además, los eventos múltiples en el gen *TP53* se relacionaron con un peor pronóstico.
4. El análisis de la arquitectura clonal permitió identificar patrones de evolución lineal, ramificada y de tipo *sweeping*, así como la emergencia de clones con significado pronóstico.
5. La adquisición de variantes de Tipo I en pacientes con SMD se asoció a transformación leucémica.
6. No se observó ningún cambio de patrón fenotípico asociado a la evolución clonal de los SMD. Sin embargo, se detectó un aumento de células mesenquimales CD13^{high} en aquellos pacientes tratados con azacitidina, con adquisición de variantes patogénicas y con transformación a LMA.

BIBLIOGRAFÍA

1. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, et al. *WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues*. 4th ed. Lyon: ; 2017.
2. Fenaux P, on behalf of the ESMO Guidelines Working Group, Haase D, et al. Myelodysplastic syndromes: ESMO clinical practice guidelines for diagnosis, treatment and follow-upΓÇä.
3. Sanz GF, Del Cañizo C, Sanz MA. Síndromes mielodisplásicos. In: Sanz Alonso MA, Carreras i Pons E, eds. *Manual práctico de hematología clínica*. 4th ed. Barcelona: Antares; 2012:161.
4. Owen C, Barnett M, Fitzgibbon J. Familial myelodysplasia and acute myeloid leukaemia-a review. *Br.J.Haematol*. 2008;140:123.
5. Godley LA, Shimamura A. Genetic predisposition to hematologic malignancies: Management and surveillance. *Blood*. 2017.
6. Bejar R. CHIP, ICUS, CCUS and other four-letter words. *Leukemia*. 2017;31(9):1869.
7. Steensma DP. Cytopenias + mutations - dysplasia = what? *Blood*. 2015;126(21):2349.
8. Shafat MS, Ganeswaran B, Bowles KM, Rushworth SA. The bone marrow microenvironment-home of the leukemic blasts. *Blood Rev*. 2017;31(5):277-286.
9. Pleyer L, Valent P, Greil R. Mesenchymal stem and progenitor cells in normal and dysplastic hematopoiesis-masters of survival and clonality? *International journal of molecular sciences*. 2016;17(7):1009.
10. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. the international society for cellular therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006;8(4):315.

11. P M, S H, R M, M G, Khan WS. Adult mesenchymal stem cells and cell surface characterization - a systematic review of the literature. *The open orthopaedics journal*. 2011;5:253-260.
12. Bühring H, Tremel S, Cerabona F, de Zwart P, Kanz L, Sobiesiak M. Phenotypic characterization of distinct human bone Marrow-Derived MSC subsets. *Ann N Y Acad Sci*. 2009;1176(1):124-134.
13. Muñiz C, Teodosio C, Mayado A, et al. Ex vivo identification and characterization of a population of CD13(high) CD105(+) CD45(-) mesenchymal stem cells in human bone marrow. *Stem cell research & therapy*. 2015;6(1):169-169.
14. Rahman MM, Subramani J, Ghosh M, et al. CD13 promotes mesenchymal stem cell-mediated regeneration of ischemic muscle. *Frontiers in physiology*. 2014;4:402-402.
15. Wang A, Zhong H. Roles of the bone marrow niche in hematopoiesis, leukemogenesis, and chemotherapy resistance in acute myeloid leukemia. *Hematology*. 2018;23(10):729-739.
16. Poon Z, Dighe N, Venkatesan SS, et al. Bone marrow MSCs in MDS: Contribution towards dysfunctional hematopoiesis and potential targets for disease response to hypomethylating therapy. *Leukemia*. 2019;33(6):1487-1500.
17. Liu Q, Zhu H, Dong J, Li H, Zhang H. Defective proliferative potential of MSCs from pediatric myelodysplastic syndrome patients is associated with cell senescence. *International journal of clinical and experimental pathology*. 2015;8(10):13059-13066.
18. Zambetti N, Ping Z, Chen S, et al. Mesenchymal inflammation drives genotoxic stress in hematopoietic stem cells and predicts disease evolution in human pre-leukemia. *Cell Stem Cell*. 2016;19(5):613-627.

19. Ramos Ortega F, Díez Campelo M. Síndromes mielodisplásicos. neoplasias mielodisplásicas/mieloproliferativas. In: Moraleda Jiménez JM, ed. *Pregrado de hematología*. 4th ed. Madrid: Luzán5; 2017:311.
20. Greenberg PL, Tuechler H, Schanz J, et al. Revised international prognostic scoring system for myelodysplastic syndromes. *Blood*. 2012;120(12):2454.
21. Steensma D. An updated risk model that improves prognostic forecasting in myelodysplastic syndromes *The Hematologist*. 2012;9(6).
22. Della Porta MG, Alessandrino EP, Bacigalupo A, et al. Predictive factors for the outcome of allogeneic transplantation in patients with MDS stratified according to the revised IPSS-R. *Blood*. 2014;123(15):2333.
23. Bejar R. Clinical and genetic predictors of prognosis in myelodysplastic syndromes. *Haematologica*. 2014;99(6):956.
24. Mufti GJ, Bennett JM, Goasguen J, et al. Diagnosis and classification of myelodysplastic syndrome: International working group on morphology of myelodysplastic syndrome (IWGM-MDS) consensus proposals for the definition and enumeration of myeloblasts and ring sideroblasts. *Haematologica*. 2008;93(11):1712.
25. Della Porta M,G., Picone C. Diagnostic utility of flow cytometry in myelodysplastic syndromes. *Mediterranean journal of hematology and infectious diseases*. 2017;9(1):e2017017; e2017017-e2017017.
26. van dL, Alhan C, Béné MC, et al. Standardization of flow cytometry in myelodysplastic syndromes: Report from the first european LeukemiaNet working conference on flow cytometry in myelodysplastic syndromes. *Haematologica*. 2009;94(8):1124.

27. Westers TM, Ireland R, Kern W, et al. Standardization of flow cytometry in myelodysplastic syndromes: A report from an international consortium and the european LeukemiaNet working group. *Leukemia*. 2012;26:1730.
28. Grupo Español de Síndromes Mielodisplásicos (GESMD), ed. *Guías españolas de SMD y LMMc*. 2nd ed. ; 2020. Bonanad S. and Vicente A., eds. ; No. 8.
29. Schanz J, Tüchler H, Solé F, et al. New comprehensive cytogenetic scoring system for primary myelodysplastic syndromes (MDS) and oligoblastic acute myeloid leukemia after MDS derived from an international database merge. *Journal of clinical oncology*. 2012;30(8):820.
30. Haase D. Cytogenetic features in myelodysplastic syndromes. *Ann Hematol*. 2008;87(7):515-526.
31. Haase D, Germing U, Schanz J, et al. New insights into the prognostic impact of the karyotype in MDS and correlation with subtypes: Evidence from a core dataset of 2124 patients. *Blood*. 2007;110(13):4385.
32. Giagounidis A. Lenalidomide for del(5q) and non-del(5q) myelodysplastic syndromes. *seminars of hematology*. 2012;49(4):312.
33. Jädersten M, Saft L, Smith A, et al. TP53 mutations in low-risk myelodysplastic syndromes with del(5q) predict disease progression. *JCO*. 2011;29(15):1971-1979.
34. Vardiman JW, Thiele J, Arber DA, et al. The 2008 revision of the world health organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: Rationale and important changes. *Blood*. 2009;114(5):937.
35. Gerhard DS, Kawasaki ES, Bancroft FC, Szabo P. Localization of a unique gene by direct hybridization in situ. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1981;78(6):3755-3759.

36. Hosono N, Makishima H, Mahfouz R, et al. Recurrent genetic defects on chromosome 5q in myeloid neoplasms. *Oncotarget*. 2016;8(4):6483-6495.
37. Gaballa MR, Besa EC. Myelodysplastic syndromes with 5q deletion: Pathophysiology and role of lenalidomide. *Ann Hematol*. 2014.
38. Papaemmanuil E, Gerstung M, Malcovati L, et al. Clinical and biological implications of driver mutations in myelodysplastic syndromes. *Blood*. 2013;122(22):3616.
39. Haferlach T, Nagata Y, Grossmann V, et al. Landscape of genetic lesions in 944 patients with myelodysplastic syndromes. *Leukemia*. 2014;28:241.
40. Palomo L, Ibáñez M, Abáigar M, et al. Spanish guidelines for the use of targeted deep sequencing in myelodysplastic syndromes and chronic myelomonocytic leukaemia. *Br J Haematol*. 2019;n/a.
41. Kennedy JA, Ebert BL. Clinical implications of genetic mutations in myelodysplastic syndrome. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2017;35(9):968-974.
42. Malcovati L, Karimi M, Papaemmanuil E, et al. *SF3B1* mutation identifies a distinct subset of myelodysplastic syndrome with ring sideroblasts. *Blood*. 2015;126(2):233.
43. Patnaik MM, Tefferi A. Cytogenetic and molecular abnormalities in chronic myelomonocytic leukemia. *Blood cancer journal*. 2016;6(2):e393-e393.
44. Yoshida K, Sanada M, Shiraishi Y, et al. Frequent pathway mutations of splicing machinery in myelodysplasia. *Nature*. 2011;478:64.

45. Wu S, Kuo Y, Hou H, et al. The clinical implication of *SRSF2* mutation in patients with myelodysplastic syndrome and its stability during disease evolution. *Blood*. 2012;120(15):3106.
46. Fleischman RA, Stockton SS, Cogle CR. Refractory macrocytic anemias in patients with clonal hematopoietic disorders and isolated mutations of the spliceosome gene *ZRSR2*. *Leuk Res*. 2017;61:104-107.
47. Li B, Liu J, Jia Y, et al. Clinical features and biological implications of different *U2AF1* mutation types in myelodysplastic syndromes. *Genes Chromosomes Cancer*. 2018;57(2):80-88.
48. Wu S, Tang J, Lin C, et al. Clinical implications of *U2AF1* mutation in patients with myelodysplastic syndrome and its stability during disease progression. *Am J Hematol*. 2013;88(11):E277-E282.
49. Thol F, Kade S, Schlarmann C, et al. Frequency and prognostic impact of mutations in *SRSF2*, *U2AF1*, and *ZRSR2* in patients with myelodysplastic syndromes. *Blood*. 2012;119(15):3578.
50. Zhang L, Padron E, Lancet J. The molecular basis and clinical significance of genetic mutations identified in myelodysplastic syndromes. *Leuk Res*. 2015;39(1):6-17.
51. Jung S, Kim Y, Yim S, et al. Somatic mutations predict outcomes of hypomethylating therapy in patients with myelodysplastic syndrome. *Oncotarget*. 2016;7(34):55264-55275.
52. Cabezón M, Bargay J, Xicoy B, et al. Impact of mutational studies on the diagnosis and the outcome of high-risk myelodysplastic syndromes and secondary acute myeloid leukemia patients treated with 5-azacytidine. *Oncotarget*. 2018;9(27):19342-19355.
53. Kuendgen A, Müller-Thomas C, Lauseker M, et al. Efficacy of azacitidine is independent of molecular and clinical characteristics - an analysis of 128 patients with myelodysplastic

syndromes or acute myeloid leukemia and a review of the literature. *Oncotarget*. 2018;9(45):27882-27894.

54. Cedena MT, Rapado I, Santos-Lozano A, et al. Mutations in the DNA methylation pathway and number of driver mutations predict response to azacitidine in myelodysplastic syndromes. *Oncotarget*. 2017;8(63):106948-106961.

55. Bejar R, Stevenson KE, Caughey B, et al. Somatic mutations predict poor outcome in patients with myelodysplastic syndrome after hematopoietic stem-cell transplantation. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2014;32(25):2691-2698.

56. Walter MJ, Ding L, Shen D, et al. Recurrent DNMT3A mutations in patients with myelodysplastic syndromes. *Leukemia*. 2011;25(7):1153-1158.

57. Lin M, Hou H, Tsai C, et al. Dynamics of DNMT3A mutation and prognostic relevance in patients with primary myelodysplastic syndrome. *Clinical epigenetics*. 2018;10:42; 42-42.

58. Molenaar RJ, Maciejewski JP, Wilmink JW, van Noorden, Cornelis J. F. Wild-type and mutated IDH1/2 enzymes and therapy responses. *Oncogene*. 2018;37(15):1949-1960.

59. DiNardo CD, Jabbour E, Ravandi F, et al. IDH1 and IDH2 mutations in myelodysplastic syndromes and role in disease progression. *Leukemia*. 2016;30(4):980-984.

60. Lin C, Hou H, Chou W, et al. IDH mutations are closely associated with mutations of DNMT3A, ASXL1 and SRSF2 in patients with myelodysplastic syndromes and are stable during disease evolution. *Am J Hematol*. 2014;89(2):137-144.

61. Wang N, Wang F, Shan N, Sui X, Xu H. *IDH1* mutation is an independent inferior prognostic indicator for patients with myelodysplastic syndromes. *Acta Haematol*. 2017;138(3):143-151.

62. Alvarez Argote J, Dasanu CA. ASXL1 mutations in myeloid neoplasms: Pathogenetic considerations, impact on clinical outcomes and survival. *Curr Med Res Opin.* 2018;34(5):757-763.
63. Mangaonkar AA, Gangat N, Al-Kali A, et al. Prognostic impact of ASXL1 mutations in patients with myelodysplastic syndromes and multilineage dysplasia with or without ring sideroblasts. *Leuk Res.* 2018;71:60-62.
64. Rinke J, Müller J.P., Blaess MF, et al. Molecular characterization of EZH2 mutant patients with myelodysplastic/myeloproliferative neoplasms. *Leukemia.* 2017;31:1936.
65. Muto T, Sashida G, Oshima M, et al. Concurrent loss of Ezh2 and Tet2 cooperates in the pathogenesis of myelodysplastic disorders. *J Exp Med.* 2013;210(12):2627-2639.
66. Gill H, Leung AYH, Kwong Y. Molecular and cellular mechanisms of myelodysplastic syndrome: Implications on targeted therapy. *International journal of molecular sciences.* 2016;17(4):440; 440-440.
67. Sood R, Kamikubo Y, Liu P. Role of RUNX1 in hematological malignancies. *Blood.* 2017;129(15):2070-2082.
68. Cao Q, Gearhart MD, Gery S, et al. BCOR regulates myeloid cell proliferation and differentiation. *Leukemia.* 2016;30(5):1155-1165.
69. Adema V, Larráyo MJ, Calasanz MJ, et al. Correlation of myelodysplastic syndromes with i(17)(q10) and TP53 and SETBP1 mutations. *Br J Haematol.* 2015;171(1):137-141.
70. Hou H, Kuo Y, Tang J, et al. Clinical implications of the SETBP1 mutation in patients with primary myelodysplastic syndrome and its stability during disease progression. *Am J Hematol.* 2014;89(2):181-186.

71. da Silva-Coelho P, Kroeze LI, Yoshida K, et al. Clonal evolution in myelodysplastic syndromes. *Nature Communications*. 2017;8:15099.
72. Meggendorfer M, De Albuquerque A, Nadarajah N, et al. Karyotype evolution and acquisition of FLT3 or RAS pathway alterations drive progression of myelodysplastic syndrome to acute myeloid leukemia. *Haematologica*. 2015.
73. Meggendorfer M, Haferlach C, Kern W, Haferlach T. Molecular analysis of myelodysplastic syndrome with isolated deletion of the long arm of chromosome 5 reveals a specific spectrum of molecular mutations with prognostic impact: A study on 123 patients and 27 genes. *Haematologica*. 2017;102(9):1502.
74. Steensma DP. Myelodysplastic syndromes current treatment algorithm 2018. *Blood Cancer Journal*. 2018;8(5):47.
75. Aleshin A, Greenberg PL. Molecular pathophysiology of the myelodysplastic syndromes: Insights for targeted therapy. *Blood Adv*. 2018;2(20):2787.
76. Rack KA, van dB, Haferlach C, et al. European recommendations and quality assurance for cytogenomic analysis of haematological neoplasms. *Leukemia*. 2019.
77. McGowan-Jordan J, Simons A, Schmid M. *ISCN 2016:An international system for human cytogenomic nomenclature (2016)*. Karger; 2016.
78. Cheson BD, Greenberg PL, Bennett JM, et al. Clinical application and proposal for modification of the international working group (IWG) response criteria in myelodysplasia. *Blood*. 2006;108(2):419-425.
79. Pal K, Bystry V, Reigl T, et al. GLASS: Assisted and standardized assessment of gene variations from sanger sequence trace data.

80. Bouaoun L, S, D., , Ardin M, Hollstein M, Byrnes G, Zavadil,J., Olivier M. *TP53 variations in human cancers: New lessons from the IARC TP53 database and genomics data. Human Mutation.* 2016;37(9):865.
81. Forbes SA, Beare D, Boutselakis H, et al. COSMIC: Somatic cancer genetics at high-resolution.
82. Miller CA, McMichael J, Dang HX, et al. Visualizing tumor evolution with the fishplot package for R. *BMC Genomics.* 2016;17(1):880.
83. Bento LC, Correia RP, Pitangueiras Manguiera CL, et al. The use of flow cytometry in myelodysplastic syndromes: A review. *Frontiers in oncology.* 2017;7:270-270.
84. Solé, Espinet, Sanz, et al. Incidence, characterization and prognostic significance of chromosomal abnormalities in 640 patients with primary myelodysplastic syndromes. *British Journal of Haematology.* 2000;108(2):346-356.
85. Mallo M, Arenillas L, Espinet B, et al. Fluorescence *in situ* hybridization improves the detection of 5q31 deletion in myelodysplastic syndromes without cytogenetic evidence of 5q-. *Haematologica.* 2008;93(7):1001.
86. Ademà V, Hernández JM, Abáigar M, et al. Application of FISH 7q in MDS patients without monosomy 7 or 7q deletion by conventional G-banding cytogenetics: Does 7/7q detection by FISH have prognostic value? *Leuk Res.* 2013;37(4):416-421.
87. Aguilera-Diaz A, Vazquez I, Ariceta B, et al. Assessment of the clinical utility of four NGS panels in myeloid malignancies. suggestions for NGS panel choice or design. *PLOS ONE.* 2020;15(1):e0227986.

88. Kon A, Shih L, Minamino M, et al. Recurrent mutations in multiple components of the cohesin complex in myeloid neoplasms. *Nat Genet.* 2013;45(10):1232-1237.
89. Abuhadra N, Mukherjee S, Al-Issa K, et al. BCOR and BCORL1 mutations in myelodysplastic syndromes (MDS): Clonal architecture and impact on outcomes. *Leuk Lymphoma.* 2019;60(6):1587-1590.
90. Ogawa S. Genetics of MDS. *Blood.* 2019;133(10):1049-1059.
91. Janusz K, del Rey M, AbÃjigar M, et al. A two-step approach for sequencing spliceosome-related genes as a complementary diagnostic assay in MDS patients with ringed sideroblasts. *Leuk Res.* 2017;56:82-87.
92. MartÃn I, Such E, Navarro B, et al. Prognostic impact of gene mutations in myelodysplastic syndromes with ring sideroblasts. *Blood Cancer Journal.* 2017;7(12):630.
93. Mangaonkar AA, Lasho TL, Finke CM, et al. Prognostic interaction between bone marrow morphology and SF3B1 and ASXL1 mutations in myelodysplastic syndromes with ring sideroblasts. *Blood Cancer Journal.* 2018;8(2):18.
94. Wang W, Routbort MJ, Tang Z, et al. Characterization of TP53 mutations in low-grade myelodysplastic syndromes and myelodysplastic syndromes with a non-complex karyotype. *Eur J Haematol.* 2017;99(6):536-543.
95. Mallo M, del Rey M, IbÃñez M, et al. Response to lenalidomide in myelodysplastic syndromes with del(5q): Influence of cytogenetics and mutations. *Br J Haematol.* 2013;162(1):74-86.

96. Lodé L, Ménard A, Flet L, et al. Emergence and evolution of TP53 mutations are key features of disease progression in myelodysplastic patients with lower-risk del(5q) treated with lenalidomide. *Haematologica*. 2018;103(4):e143-e146.
97. Bejar R, Stevenson K, Abdel-Wahab O, et al. Clinical effect of point mutations in myelodysplastic syndromes. *N Engl J Med*. 2011;364(26):2496-2506.
98. Smith AE, Mohamedali AM, Kulasekararaj A, et al. Next-generation sequencing of the TET2 gene in 355 MDS and CMML patients reveals low-abundance mutant clones with early origins, but indicates no definite prognostic value. *Blood*. 2010;116(19):3923-3932.
99. Kosmider O, Gelsi-Boyer V, Cheok M, et al. TET2 mutation is an independent favorable prognostic factor in myelodysplastic syndromes (MDSs). *Blood*. 2009;114(15):3285-3291.
100. Papaemmanuil E, Cazzola M, Boultonwood J, et al. Somatic SF3B1 mutation in myelodysplasia with ring sideroblasts. *N Engl J Med*. 2011;365(15):1384-1395.
101. Kwok B, Mohrmann R, Janatpour K, et al. Next-generation sequencing of ASXL1, TP53, RUNX1, EZH2, and ETV6 identifies a significant proportion of lower-risk myelodysplastic syndromes with poor prognostic indicators. *Blood*. 2013;122(21):1552-1552.
102. Wang H, Zhang N, Wu X. Prognostic value of U2AF1 mutations in patients with de novo myelodysplastic syndromes: A meta-analysis. *Annals of Hematology*. 2019;98:2629.
103. Kang M, Kim H, Seo B, et al. The prognostic impact of mutations in spliceosomal genes for myelodysplastic syndrome patients without ring sideroblasts. *BMC Cancer*. 2015;15:484-484.
104. Takahashi K, Patel K, Bueso-Ramos C, et al. Clinical implications of TP53 mutations in myelodysplastic syndromes treated with hypomethylating agents. *Oncotarget*. 2016;7(12):14172-14187.

105. Haase D, Stevenson KE, Neuberg D, et al. TP53 mutation status divides myelodysplastic syndromes with complex karyotypes into distinct prognostic subgroups. *Leukemia*. 2019;33(7):1747-1758.
106. Bernard E, Nannya Y, Hasserjian RP, et al. Implications of *TP53* allelic state for genome stability, clinical presentation and outcomes in myelodysplastic syndromes. *bioRxiv*. 2019:2019.12.19.868844.
107. Schanz J, Cevik N, Fonatsch C, et al. Detailed analysis of clonal evolution and cytogenetic evolution patterns in patients with myelodysplastic syndromes (MDS) and related myeloid disorders. *Blood cancer journal*. 2018;8(3):28-28.
108. Jabbour E, Takahashi K, Wang X, et al. Acquisition of cytogenetic abnormalities in patients with IPSS defined lower-risk myelodysplastic syndrome is associated with poor prognosis and transformation to acute myelogenous leukemia. *Am J Hematol*. 2013;88(10):831-837.
109. Neukirchen J, Lauseker M, Hildebrandt B, et al. Cytogenetic clonal evolution in myelodysplastic syndromes is associated with inferior prognosis. *Cancer*. 2017;123(23):4608-4616.
110. Bernasconi P, Klersy C, Boni M, et al. Does cytogenetic evolution have any prognostic relevance in myelodysplastic syndromes? A study on 153 patients from a single institution. *Ann Hematol*. 2010;89(6):545-551.
111. Haferlch C. Cytogenetic clonal evolution in MDS is associated with shifts towards unfavorable karyotypes according to IPSS and shorter overall survival: A study on 988 MDS patients studied sequentially by chromosome banding analysis. 53rd ASH annual meeting and exposition. *blood*.118, 968 (2011). 2011;118:968.

112. Walter MJ, Shen D, Ding L, et al. Clonal architecture of secondary acute myeloid leukemia. *N Engl J Med*. 2012;366(12):1090-1098.
113. Makishima H, Yoshizato T, Yoshida K, et al. Dynamics of clonal evolution in myelodysplastic syndromes. *Nat Genet*. 2017;49(2):204-212.
114. Mossner M, Jann J, Wittig J, et al. Mutational hierarchies in myelodysplastic syndromes dynamically adapt and evolve upon therapy response and failure. *Blood*. 2016;128(9):1246-1259.
115. Platt MY, Fathi AT, Borger DR, et al. Detection of dual IDH1 and IDH2 mutations by targeted next-generation sequencing in acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndromes. *The Journal of molecular diagnostics : JMD*. 2015;17(6):661-668.
116. Figueroa ME, Abdel-Wahab O, Lu C, et al. Leukemic IDH1 and IDH2 mutations result in a hypermethylation phenotype, disrupt TET2 function, and impair hematopoietic differentiation. *Cancer cell*. 2010;18(6):553-567.
117. Bacher U, Haferlach T, Schnittger S, et al. Investigation of 305 patients with myelodysplastic syndromes and 20q deletion for associated cytogenetic and molecular genetic lesions and their prognostic impact. *Br J Haematol*. 2014;164(6):822-833.
118. Tabarrokhi A, Zhang L, Visconte V, et al. Molecular mutations in U2AF1 are most commonly found in Del20q myelodysplastic syndromes but do not lead to poor prognosis in this karyotypic subtype. *Blood*. 2012;120(21):3804-3804.
119. Li B, Zou D, Yang S, Ouyang G, Mu Q. Prognostic significance of U2AF1 mutations in myelodysplastic syndromes: A meta-analysis. *J Int Med Res*. 2019:0300060519891013.

120. Martínez-Losada C, Serrano-López J, Serrano-López J, et al. Clonal genetic evolution at relapse of favorable-risk acute myeloid leukemia with NPM1 mutation is associated with phenotypic changes and worse outcomes. *Haematologica*. 2018;103(9):e400-e403.
121. Wenk C, Garz A, Grath S, et al. Direct modulation of the bone marrow mesenchymal stromal cell compartment by azacitidine enhances healthy hematopoiesis. *Blood advances*. 2018;2(23):3447-3461.
122. Korn C, Méndez-Ferrer S. Myeloid malignancies and the microenvironment. *Blood*. 2017;129(7):811-822.
123. DiNardo CD, Stein EM, de Botton S, et al. Durable remissions with ivosidenib in IDH1-mutated relapsed or refractory AML. *N Engl J Med*. 2018;378(25):2386-2398.
124. Stein EM, DiNardo CD, Pollyea DA, et al. Enasidenib in mutant *IDH2* relapsed or refractory acute myeloid leukemia. *Blood*. 2017;130(6):722.
125. Navada SC, Fruchtman SM, Odchimar-Reissig R, et al. A phase 1/2 study of rigosertib in patients with myelodysplastic syndromes (MDS) and MDS progressed to acute myeloid leukemia. *Leuk Res*. 2018;64:10-16.
126. Reddy EP, Divakar SK, Vasquez-Del Carpio R, et al. Rigosertib blocks RAS signaling by acting as a small molecule RAS mimetic that binds to the RAS-binding domains of RAS effector proteins. *Blood*. 2014;124(21):5616.
127. Garcia-Manero G, Fenaux P, Al-Kali A, et al. Rigosertib versus best supportive care for patients with high-risk myelodysplastic syndromes after failure of hypomethylating drugs (ONTIME): A randomised, controlled, phase 3 trial. *The Lancet Oncology*. 2016;17(4):496-508.

PUBLICACIONES

- **Atance, M.**; Maietta, P.; Botet, J.; Soto, C.; Pérez, MA.; Alonso-Domínguez, JM.; Castaño, T.; Arquero, T.; Lopez-Lorenzo, JL.; Velasco, A.; Pascual, A.; Martos, R.; Llamas, P.; Álvarez, S.; Cigudosa, J.; Salgado, RN. Genetic characterization and clonal evolution in MDS: analysis of 106 consecutive MDS patients and review of the literature (en preparación).
- **Atance, M.**; Serrano, J.; Serrano, C.; Arquero, T.; Suarez, J.; Pérez, MA.; Velasco, A.; Pascual, A.; Martos, R.; Alonso-Domínguez, JM.; Castaño, T.; Lopez-Lorenzo, JL.; Soto, C.; Corti, MJ.; Maietta, P.; Botet, J.; Álvarez, S.; Cigudosa, J.; Llamas, P.; Salgado, RN. Relationship between MSC and clonal evolution in azacytidine-treated MDS and CMML patients (en preparación).

Otras publicaciones:

- Prieto-Torres, L.; Chamizo, C.; Salgado, R.; **Atance, M.**; Soto, C.; Alonso Domínguez, J.; Arquero, T.; Piris, M.; Requena, L.; Rodríguez-Pinilla, S. Inflammatory Cells in Atypical Eruption of Lymphocyte Recovery Carry the Same Mutations as Neoplastic Myeloid Cells. [Am J Dermatopathol](#). 2019.
- Pérez-Sáenz, MA.; Rodríguez Pinilla, MS.; Salgado, RN.; Carvajal, N.; Serrano, C.; Soto, C.; Serrano, J.; **Atance, M.**; Lopez-Lorenzo, JL.; Requena, L.; Rojo, F.; Piris, MA; Llamas Sillero, P; Alonso-Dominguez, JM.; Three Monocytic Neoplasms in a Single Patient. *Leukemia and Lymphoma*, 2020.

COMUNICACIONES EN CONGRESOS

- **Atance, M.**; Maietta, P.; Soto, C.; Perez MA.; Llamas P.; Alvarez S.; Cigudosa J.; Salgado RN. Clinical and biological characterization of 53 MDS patients using a targeted gene next generation sequencing panel. 14th International Symposium on Myelodysplastic Syndromes. Leuk Res 2017, 55 (Sup. 1): S154 P. 268.
- **Atance, M.**; Maietta P.; Botet, J.; Soto, C.; Pérez, MA.; Velasco, A.; Llamas, P.; Álvarez, S.; Cigudosa, J.; Salgado, RN. Estudio de la evolución clonal de 17 smd mediante secuenciación masiva: adquisición de nuevas mutaciones y aumento del riesgo de transformación a LMA. LIX Congreso Nacional de la Sociedad Española de Hematología y Hemoterapia. Haematologica 2017, 102(Sup. 4) P.33 CO-046
- **Atance, M.**; Maietta, P.; Botet, J.; Soto, C.; Pérez, M.; Velasco, A.; Pascual, A.; Morillo, D.; Llamas, P.; Álvarez, S.; Cigudosa, J.; Salgado RN. Estudio del perfil mutacional de 84 síndromes mielodisplásicos: asociación con datos clínico-biológicos. LIX Congreso Nacional de la Sociedad Española de Hematología y Hemoterapia. Haematologica 2017, 102(Sup. 4) P.272 PC-324